

Tesis Doctoral

# Caracterización fenotípica y molecular de *Aspergillus* sección Flavi. Estudio de la genética poblacional y capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en maní

Pildain, María Belén

2006

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pildain, María Belén. (2006). Caracterización fenotípica y molecular de *Aspergillus* sección Flavi. Estudio de la genética poblacional y capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en maní. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pildain, María Belén. "Caracterización fenotípica y molecular de *Aspergillus* sección Flavi. Estudio de la genética poblacional y capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en maní". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

**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 Biodiversidad y Biología Experimental***

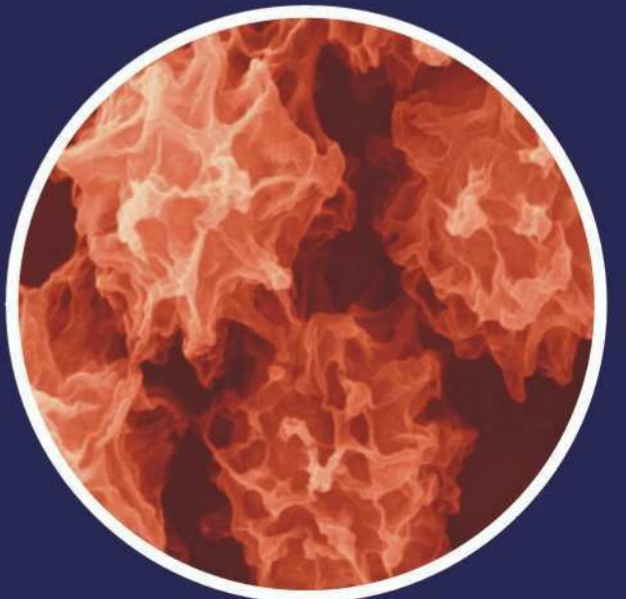
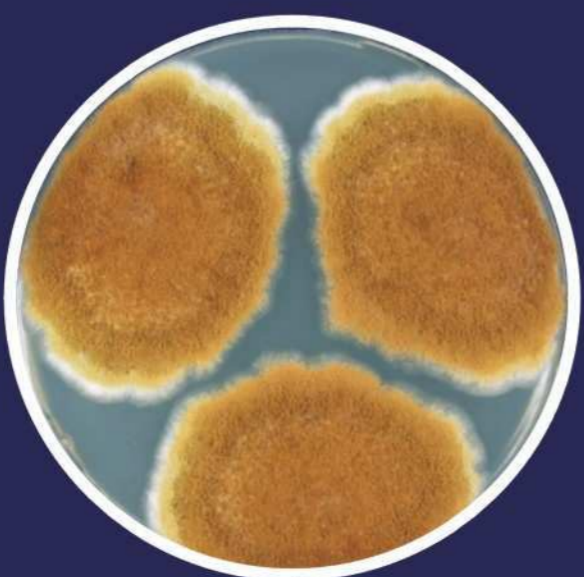
**Caracterización fenotípica y molecular  
de *Aspergillus* sección *Flavi*.  
Estudio de la genética poblacional  
y capacidad toxigénica  
de *Aspergillus flavus* en maní.**

Tesis presentada para optar  
al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

***Lic. María Belén Pildain***

**Directores: Dra. Graciela Vaamonde  
Dr. Daniel Cabral**

***Buenos Aires, 2006***





**Caracterización fenotípica y molecular de  
*Aspergillus* sección *Flavi*.  
Estudio de la genética poblacional y  
capacidad toxigénica  
de *Aspergillus flavus* de maní.**

**JURADOS:**



***Mis agradecimientos van para:***

Mis Directores, Graciela y Daniel, por brindarme la oportunidad de trabajar en lo que me gusta.

Al Dr. Robert Samson y Jens Frisvad por su calidez y por transmitirme su conocimiento sobre *Aspergillus*.

Silvia, por ser siempre mi primera maestra. Gracias por confiar en mi trabajo.

Andrea, por hacer que cuando miro al MO me entusiasme, así esté viendo una espora simple y lisa. Ah, me olvidaba!, Andre, nosotras no somos consumistas, solo nos gusta ir de compras.

Ceci, por ser mi compañera de clases y por darme alas. La seminarista , es tuya no?.

Mis compañeros (Cora, Leo, Susana) por hacer lindo el día a día. Chicos, van a usar la compu?. Si no, ya que están parados, me alcanzan el edulcorante?.

Andrea, Estela, Gabi, Laura, Pamela y Virginia por hacerme sentir siempre que cuando bajaba al 3er. piso era una más del laboratorio.

Pepita y Javier, por su cariño, charlas y cuestiones estadísticas.

Ale, Laura, Susana y Vale por ayudarme siempre que lo necesité.

Los Ing. C. Roggero, J. Minetti y C. Giandana y al INTA por proveernos de muestras de maní. Asimismo al Ing. A. Krapovickas por colaborar con el muestreo en la provincia de Corrientes y con la identificación de las especies de *Arachis*.

Mercedes y Bruna, por su cariño.

Mis Amigos de acá (Cybele, Cora, Dani, Fran, Graciela, Jime, Juan, Luly, Lupe, Mache y Vicky) y de allá (Bibi, Laura y Silvia). Los quiero lindos, Uds. son maravillosos.

Peny, Daniel, Dani y Ele. Por hacerme sentir parte de su familia.

Mi Flia. (tías, tíos, primos, sobrinos) una familia no se elige, pero si pudiera igual nunca los cambiaría. Caro, gracias por darme la inmensa alegría de ser madrina de Agustina. Gloria y Poty, Uds. Son mis tías del alma.

Mi mamá, mi papá y mi hermano porque los quiero tanto que siempre me hacen bien. Romi bienvenida a la flia., y gracias por Valentina.

Pablo, gracias por estar siempre a mi lado, sos la persona más importante para mi.

A **Pablo**, mi amor y compañero

A mi **Familia**, mis raíces

A **Valentina**, porque con solo  
nombrarla me llena de alegría

*“Cambiaré de opinión tantas veces y tan a menudo  
como adquiriera nuevos conocimientos,  
el día que perciba que mi cerebro ha dejado de ser apto  
para esos cambios, dejaré de trabajar.”*

**Florentino Ameghino**

## NDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. El género <i>Aspergillus</i> y sus especies</b>	3
1.1 Importancia	3
1.2 Diagnósis	4
1.3 Taxonomía	5
1.4 La sección <i>Flavi</i>	6
1.5 <i>A. flavus</i>	9
1.5.1 Descripción y biología	9
1.5.2 Toxinas	12
1.5.2.a Aflatoxinas	12
1.5.2.b Acido ciclopiazónico	15
1.5.2.c Otras toxinas	15
1.6 Prevención de <i>Aspergillus</i> y sus micotoxinas en los cultivos	16
<b>2. Compatibilidad Vegetativa</b>	17
2.1 <i>Mating Type</i> y Compatibilidad Vegetativa	17
2.2 Parasexualidad. Ventajas adaptativas	20
2.3 La heterocariosis en el estudio de hongos patogénicos	21
2.4 Estudios de Compatibilidad vegetativa en <i>Aspergillus flavus</i>	22
<b>3. Sistemática Filogenética</b>	23
3.1 Inferencia filogenética	23
3.2 Caracteres moleculares en filogenia	24
3.3 Alineamiento	25
3.4 Métodos de reconstrucción filogenética	25
3.5 Congruencia y calidad de datos. <i>Bootstrap</i>	27
3.6 Empleo de filogenia molecular para el estudio de especies de <i>Aspergillus</i>	27
<b>4. Antecedentes del estudio de <i>Aspergillus</i> en La Argentina</b>	28
<b>5. El Maní</b>	29
5.1 Breve descripción botánica del género <i>Arachis</i>	29
5.2 Importancia de las especies silvestres del género <i>Arachis</i>	31



5.3 <i>A. hypogaea</i>	32
5.3.1 Taxonomía	32
5.3.2 Producción utilización y ecología	33
<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	37
<b>HIPÓTESIS GENERALES</b>	38
<b>SECCIÓN I.</b> Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> a partir de hojas y semillas de maní cultivado y hojas de maní nativo.	
<b>Introducción de la sección</b>	39
<b>Objetivos particulares</b>	39
<b>Hipótesis</b>	40
<b>Materiales y Métodos</b>	40
1. Aislamiento de cepas de <i>A. flavus</i> a partir de semillas de maní cultivado	40
1.1 Muestreo de semillas de maní cultivado ( <i>A. hypogaea</i> )	40
1.2 Aislamiento de <i>A. flavus</i>	41
2. Aislamiento de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> a partir de hojas de maní cultivado y nativo	42
2.1 Muestreo de hojas de maní cultivado y nativo	42
2.2 Aislamiento de <i>A. flavus</i> y otras especies de la sección <i>Flavi</i>	42
2.3 Identificación de <i>A. flavus</i> y otras especies de la sección	44
3. Caracterización climática de las zonas muestreadas	45
4. Análisis estadístico	45
<b>Resultados</b>	46
1. Aislamiento, caracterización e identificación de cepas de <i>A. flavus</i> de semillas de maní de las provincias de Formosa, Salta y Corrientes	46
2. Aislamiento e identificación de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> a partir de hojas de maní cultivado y nativo	47
<b>Discusión</b>	51
<b>Conclusiones parciales</b>	55
<b>SECCIÓN II.</b> Producción de esclerocios. Capacidad toxigénica	
<b>Introducción de la sección</b>	56

<b>Objetivos particulares</b>	57
<b>Hipótesis</b>	57
<b>Materiales y Métodos</b>	57
1. Aislamientos de <i>A. flavus</i>	57
2. Producción de esclerocios, número y tamaño	58
3. Capacidad toxigénica. Producción de aflatoxinas tipo B y G y ácido ciclopiazónico	59
4. Análisis estadístico	60
Resultados	61
1. Producción de esclerocios	61
2. Capacidad toxigénica. Producción de aflatoxinas tipo B y G y ácido ciclopiazónico	65
3. Relación entre la producción de esclerocios y aflatoxinas	68
<b>Discusión</b>	71
<b>Conclusiones parciales</b>	78
<b>SECCIÓN III. Compatibilidad Vegetativa</b>	
<b>Introducción de la sección</b>	80
Técnica de análisis de compatibilidad vegetativa (VC)	80
<b>Objetivos particulares</b>	81
<b>Hipótesis</b>	82
<b>Materiales y Métodos</b>	82
1. Aislamiento de posibles mutantes <i>nit</i>	83
2. Clasificación de los mutantes <i>nit</i>	84
3. Reconocimiento de los heterocariontes	84
3.1 Estudio de autocompatibilidad	84
3.2 Estudio de compatibilidad vegetativa entre las distintas cepas	
4. Establecimiento de los VCGs	85
5. Análisis estadístico	86
<b>Resultados</b>	88
1. Obtención de Mutantes	88
1.1 Aislamiento de los posibles mutantes	88

1.2 Clasificación de los mutantes	88
2. Estudio de autocompatibilidad	89
3. Estudio de VC entre las distintas cepas	90
3.1 Formosa	90
3.2 Salta	91
3.3 Corrientes	94
4. Establecimiento de VCGs de <i>A. flavus</i> en la Argentina	96
5. Cepas atípicas de Argentina, Australia, Benin y Estados Unidos	98
<b>Discusión</b>	99
<b>Conclusiones parciales</b>	106
<b>SECCIÓN IV. Revisión de la sección <i>Flavi</i></b>	
<b>Introducción de la sección</b>	108
<b>Objetivos particulares</b>	109
<b>Hipótesis</b>	109
<b>Materiales y Métodos</b>	110
1. Cepas utilizadas en el estudio	110
2. Caracterización morfológica	110
3. Análisis de extrolitos en cultivo	113
4. Análisis filogenético	114
4.1 Extracción y cuantificación del ADN genómico	114
4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	114
4.3 Secuenciación de ADN	115
4.3.1 Preparación y cuantificación de los templados	115
4.3.2 Reacción de secuenciación	116
4.3.3 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	116
4.4 Elección de grupo externo	117
<b>Resultados</b>	117
1. Caracterización morfológica	117
2. Análisis de extrolitos en cultivo	127
3. Análisis filogenético	138
<b>Discusión</b>	144
1. Correlación de los clados molecularmente definidos, caracterización morfológica y químicas	145

2. Consideraciones taxonómica	148
<b>Conclusiones parciales</b>	153
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	155
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	157
<b>ANEXO</b>	
1. Medios de cultivo y reactivos	<i>I</i>
2. Análisis estadístico	<i>III</i>
3. Análisis de extrolitos	<i>VII</i>

**Caracterización fenotípica y molecular de *Aspergillus* sección *Flavi*.  
Estudio de la genética poblacional y capacidad toxigénica  
de *Aspergillus flavus* de maní.**

**RESUMEN**

*Aspergillus flavus* es uno de los principales productores de aflatoxinas, carcinógeno de grado 1. La Argentina es un país agrícola donde el cultivo de maní (*Arachis hypogaea*) es uno de los más rentables, pero también uno de los más susceptibles de ser atacados por *Aspergillus*. El origen del maní cultivado proviene de Argentina y Bolivia, donde se encuentran distribuidas las especies nativas del género y sobre las cuales no existen estudios sobre los hongos productores de micotoxinas asociados.

Por primera vez se realizó un relevamiento de especies nativas de *Arachis* y se aislaron *Aspergillus* de la sección *Flavi*, comparando la diversidad fúngica de las especies nativas y cultivadas.

Se estudió la estructura poblacional de *A. flavus* de semillas de maní en base a la técnica de compatibilidad vegetativa, potencial toxigénico y producción de esclerocios de tipo S o L.

Se llevó a cabo una revisión de la sección *Flavi* utilizando características morfológicas, filogenia molecular y perfil de producción de extrolitos.

Los resultados mostraron que existen diferencias en la proporción y especies de la sección *Flavi* asociados a las especies de *Arachis*. Mas del 90% de *A. flavus* produjeron aflatoxinas y cerca del 100%, ácido ciclopiazónico. Las cepas S produjeron aflatoxinas tipo B y G. El porcentaje de las cepas L es mas alto que el de las cepas S. La presencia de un alto numero de VCGs con un solo aislamiento y el bajo número de grupos de compatibilidad vegetativa que incluyeron aislamientos de diferentes zonas agroecológicas demostraron la alta diversidad poblacional de *A. flavus* en nuestro país. Cepas tipo L y S de *A. flavus* actúan de diferente manera, presentan diferencias morfológicas, perfil de producción de extrolitos y quedan agrupadas en diferentes clados.

Las especies nativas de *Arachis* podrían actuar como reservorios de *Aspergillus* sección *Flavi*. El alto potencial toxigénico de las especies de *Aspergillus* y la alta diversidad genética de *A. flavus* son factores importantes cuando se debe elegir y formular medidas de control a aplicar en el campo. La heterogeneidad en las poblaciones derivadas de las semillas de maní sugiere que las poblaciones de *A. flavus* se encuentran bajo continuos cambios temporales y espaciales.

La sección *Flavi* se caracteriza por la superposición de caracteres entre los miembros del grupo por lo cual el estudio taxonómico requiere de la utilización de diferentes disciplinas. Del análisis filogenético se concluye que la habilidad de producir aflatoxinas fue perdida (o ganada) varias veces en la evolución de los integrantes de la sección. Se describen 2 nuevas especies.

*Palabras clave:* *Aspergillus flavus*; maní; compatibilidad vegetativa;  $\beta$ -tubulina; extrolitos; sección *Flavi*; *Arachis* nativas.

**Phenotypic and molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi*.  
Study of the population genetic and toxigenic capability  
of the *Aspergillus flavus* strains from peanut.**

**ABSTRACT**

*Aspergillus flavus* is one of the principal producers of aflatoxins, a class 1 carcinogen. Argentina is an agricultural country where peanut (*Arachis hypogaea*) is one of the best profitable but also one of the most susceptible to be attacked for *Aspergillus*. The origin of the cultivated peanut was in Argentina and Bolivia and until now does not exist studies of micotoxin producers fungi associated with the natural native species of *Arachis*.

For the first time *Aspergillus* section *Flavi* strains were isolated from native species of *Arachis* and a comparison of the fungal diversity between native and cultivated peanut was made. The population structure of *A. flavus* from stored peanut seeds was studied by using vegetative compatibility toxigenic potential and L and S sclerotial production.

A taxonomic revision of the section *Flavi* was made, by using morphologic characteristics, molecular phylogeny and extrolite production.

The result shows differences in the proportion of section *Flavi* species associated with *Arachis* species. More than 90% of the *A. flavus* isolates were aflatoxin producers and almost 100% of them produce cyclopiazonic acid. The S strain produces aflatoxins type B and G. The percentage of the L strain is higher than S strain. Genetic diversity of *A. flavus* in Argentina is elevated and was indicated by the presence of many single-isolate vegetative compatibility groups as well as by the lower number of vegetative compatibility groups that have members of different agroecological zones. S and L strains acts different, they present different morphological characteristics, extrolite production and are in different clades.

The native species of *Arachis* could act as reservoirs of *Aspergillus* section *Flavi*. The elevated toxigenic potential of the *Aspergillus* species strains isolated and the high diversity stabilized for *A. flavus* are important factors for the application and development of control measures in the field. The heterogeneity in the populations derived from peanut seeds at diverse locations in Argentina suggests that *A. flavus* populations have undergone spatial and temporal changes.

The Section *Flavi* is characterized by the superposition of characteristics between their members, for this reason the taxonomic study requires the use of different disciplines. The phylogenetic study shows that the ability of aflatoxin production was lost (or gained) several times during evolution. Two new species were described.

*Key words:* *Aspergillus flavus*; peanut; vegetative compatibility;  $\beta$ -tubulin; extrolite; section *Flavi*; native *Arachis*.





## 1. EL GÉNERO *ASPERGILLUS* Y SUS ESPECIES

### 1.1 Importancia

*Aspergillus* se encuentra entre los géneros fúngicos más reconocidos y mejor estudiados. La primera descripción del género *Aspergillus* Link data de 1729, y fue realizada por Micheli en "Nova Plantarum Genera", pero recién a mediados del siglo XX comenzó a ser reconocido como un agente activo en la síntesis de compuestos químicos, transformaciones biosintéticas y producción enzimática. Reconociéndose además especies del género importantes en el deterioro de alimentos por ser productoras de metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) (Pitt & Hocking, 1997).

Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Muchas de ellas son xerófilas, y capaces de deteriorar alimentos que apenas exceden los límites seguros de humedad. Un gran número de especies están también estrechamente relacionadas con alimentos humanos, particularmente cereales y nueces (Pitt & Hocking, 1985). Si bien algunas especies se utilizan en la producción de alimentos, por ejemplo *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn en la manufactura de salsa de soja, la mayoría de las especies de *Aspergillus* aparecen en los alimentos como agentes de deterioro (Hocking, 1997).

La relación entre *Aspergillus* y el deterioro de alimentos ha sido establecido hace tiempo; la era moderna de la micotoxicología comenzó en 1960 con la ocurrencia de la "Turkey X disease" (enfermedad X de los pavos) en el Reino Unido y el subsiguiente descubrimiento de que *A. flavus* Link es altamente toxigénico. Las especies micotoxigénicas más importantes dentro del género son *A. flavus* y *A. parasiticus* Speare, que producen aflatoxinas, *A. ochraceus* K. Wilh. (ocratoxina) y *A. versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi (esterigmatocistina) (ICMSF, 1996). *A. niger* Tieghem, una especie ampliamente distribuida en la naturaleza y utilizada para la producción industrial de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y enzimas como la amiloglucosidasa y antocianasa (Wainwright, 1992), ha sido caracterizada recientemente como productora de ocratoxina, al igual que otras especies relacionadas (*A. carbonarius* (Bainier) Thom) (Abarca *et al.*, 2001) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales micotoxinas producidas por especies del género *Aspergillus*

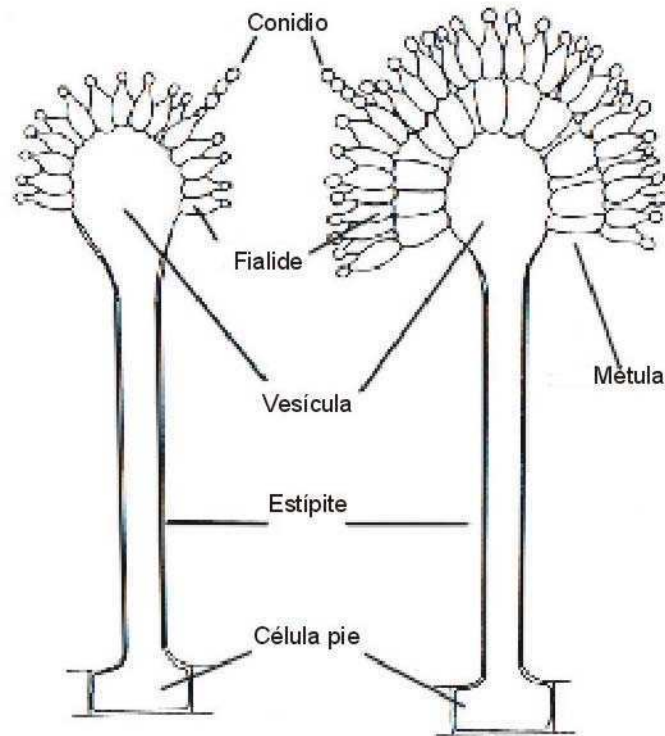
<i>Micotoxinas</i>	<i>Toxicidad</i>	<i>Especies productoras</i>
Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	Daño agudo del hígado, cirrosis, carcinogénicas (hígado), teratogénicas, inmunosupresivas	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ac. ciclopiazónico	Degeneración y necrosis de varios órganos, tremorgénico, baja toxicidad oral	<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i>
Ocratoxina A	Necrosis de riñón (especialmente en cerdos), teratogénica, inmunosupresiva, carcinogénica	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> y especies relacionadas
Esterigmatocistina	Daño agudo de hígado y riñón, carcinogénica (hígado)	<i>A. versicolor</i> , <i>Emericella</i> spp.
Fumitremorgenos	Tremorgénicos (ratas y ratones)	<i>A. fumigatus</i>
Territrems	Tremorgénicos (ratas y ratones)	<i>A. terreus</i>
Triptoquivalinas	Tremorgénicos	<i>A. clavatus</i>
Citocalasinas	Citotóxicas	<i>A. clavatus</i>

## 1.2 Diagnósis

*Aspergillus* es un género caracterizado, en términos generales, por la formación de conidióforos con estípites largos generalmente no septados y ápices usualmente ensanchados formando una vesícula aproximadamente esférica, aunque en algunas especies son más elongadas y no tan conspicuamente ensanchadas, y llevan fialides o métulas y fialides en toda su superficie o en parte de ella (Fig. 1). Los conidióforos y cabezuelas están originados a partir de una célula especializada denominada “célula pie” (Fig. 1). Los conidios varían en color, tamaño y forma (Raper & Fennell, 1965; Pitt & Hocking, 1997). Los ascocarpos, son desconocidos en la mayoría de las especies del género, sólo están presentes en aquellas especies que presentan reproducción sexual y son del tipo cleistotecioide. Los esclerocios se encuentran regularmente presentes en algunas especies, usualmente globosos o subglobosos (Raper & Fennell, 1965).

Una rápida determinación de miembros de este género puede ser obtenida por examinación a microscopio óptico de los conidióforos típicos de *Aspergillus*, una de las características más útiles para la identificación taxonómica de especies del género (Pitt & Hocking, 1997).

**Figura 1.** Esquema de las estructuras morfológicas características del género *Aspergillus*



### 1.3 Taxonomía

*Aspergillus* es un género anamórfico del grupo no taxonómico de los Deuteromycetes. Cuando las especies del género presentan reproducción sexual se las ubica dentro de los géneros *Chaetosartorya* Subramanian, *Emericella* Berk, *Eurotium* Link, *Fennellia* B.J. Wiley & E.G. Simmons, *Hemicarpenales* K. Sarbhoy & Elphick, *Neosartorya* Malloch & Cain, *Petromyces* Malloch & Cain, *Sclerocleista* Subramanian y *Warcupiella* Subramanian. Estos estados teleomórficos se encuentran en la familia *Trichocomaceae* E. Fisch., del orden *Eurotiales* Mesch., perteneciente al *Phylum* *Ascomycota* (Alexopoulos, *et al.*, 1996).

Si bien existe un gran número de géneros teleomórficos (ascospóricos) que tienen estados conidiales *Aspergillus*, los únicos de real importancia en alimentos son el género xerófilo *Eurotium*, especies de *Neosartorya*, que producen ascosporas termorresistentes y pueden causar deterioro en alimentos procesados por calor, y el género *Emericella*, que aunque no es muy común en alimentos, ha sido aislado de una amplia variedad de sustratos, entre ellos los cereales y derivados (Pitt & Hocking, 1985).

La taxonomía más ampliamente utilizada ha sido la de Raper y Fennell (1965). En esta monografía se aceptaban 132 especies subdivididas en 18 grupos basadas principalmente en características morfológicas y de cultivo. Samson (1979) realizó una recopilación de las especies y variedades descritas posteriormente, con una revisión crítica sobre la validez de los taxones publicados, mientras que Kozakiewicz (1989) efectuó una revisión posterior basándose en la morfología de los conidios observados en microscopía electrónica, describiendo más de 150 especies.

La sistemática actual de *Aspergillus* se ha visto influida enormemente por los trabajos presentados en dos reuniones científicas dedicadas exclusivamente a los géneros *Penicillium* Link y *Aspergillus* (Samson & Pitt, 1985; Samson & Pitt, 1990). En ellas se realizaron importantes contribuciones multidisciplinarias a la taxonomía del género, y en especial se revisó su nomenclatura siguiendo las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN). La monografía de Raper y Fennell (1965) presentaba serios problemas de adecuación a dicha normativa, ya que no se había tenido en cuenta la prioridad de los nombres más antiguos y las nuevas especies descritas no estaban tipificadas (Abarca, 2000).

Estos errores fueron corregidos por Samson y Gams (1985) y Kozakiewicz (1989) quienes tipificaron y nombraron correctamente a todas las especies. Además, la clasificación intragenérica en grupos no es aceptada por el ICBN, por lo que Gams *et al.* (1985) reclasificaron el género y lo dividieron en 5 subgéneros, cada uno de los cuales está dividido a su vez en una o más secciones (Tabla 2) que se corresponden con los 18 grupos descritos por Raper y Fennell (1965). Peterson (2000), basado en estudios filogenéticos y secuencias de RNA ribosomal, redujo a 3 el número de subgéneros, (Tabla 2) aunque actualmente la clasificación propuesta por Gams *et al.*, (1985) es la aceptada por la mayoría de los investigadores que estudian el género *Aspergillus* (Varga *et al.*, 2003). Una taxonomía moderna de las especies más comunes de *Aspergillus*, incluyendo las de importancia en alimentos, es provista por Klich y Pitt (1988a), mientras que Varga, *et al.*, (2003) mostraron las relaciones evolutivas de especies de *Aspergillus* productoras de micotoxinas, orientado principalmente a los grupos productores de ocratoxina (sección *Circumdati*) y aflatoxinas (sección *Flavi*). (Tabla 3).

#### 1.4 La sección *Flavi*

La sección *Flavi*, comúnmente conocida como “grupo *A. flavus*” se encuentra ubicada dentro del subgénero *Circumdati*, está integrada por especies de gran importancia económica que se caracterizan por la ausencia de estructuras de reproducción sexual y por presentar cabezuelas conidiales en tonos verdosos – amarillentos y esclerocios oscuros (Peterson, 2000). Entre ellas se pueden reconocer a: *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, *A. tamaritii* Kita, *A. pseudotamaritii* Ito *et al.*, *A. caelatus* BW Horn, *A. nomius* Kurtzman Horn & Hesseltine, *A. bombycis* Peterson *et al.*, *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn, y *A. sojae* Sakaguchi & Yamada *ex* Murakami, entre otras (Tabla 3). Algunas especies son productoras de toxinas importantes como las aflatoxinas y el ácido ciclopiazónico.

La diversificación de las especies de la sección hace muy dificultosa su identificación con los métodos morfológicos y fisiológicos convencionales, debido a que las características que las definen se encuentran muy solapadas. Es por este motivo que en la actualidad, al igual que en otros campos de la Micología, se trata de efectuar estudios que incluyan metodologías morfológicas, fisiológicas, químicas y genéticas. Uno de los caracteres morfológicos más importantes es la ornamentación de la pared del conidio, y junto con características fisiológicas tales como el crecimiento a diferentes temperaturas, son los más utilizados para realizar una rápida determinación aproximada entre especies. Pero para lograr una correcta determinación es necesario sumar análisis de extrolitos y análisis moleculares como secuenciación de distintos genes (Klich & Pitt, 1988a; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001).

Análisis filogenéticos de la sección, basados en las secuencias de las regiones intergénicas (ITS), indican que esta se encuentra formada por 3 principales clados (*A. flavus*, *A. tamaritii* y *P. alliaceus*) que tienen correlación con características morfológicas y del sistema de las ubiquinoas (Tabla 3) (Rigó *et al.*, 2002). Los clados *A. flavus* y *A. tamaritii* incluyen a las especies productoras de micotoxinas con gran importancia económica, a las que se deben sumar las especies gemelas *A. bombycis* *et al.* y *A. nomius* (Tabla 3).

El hecho de que las especies productoras de aflatoxinas (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis* y *A. pseudotamaritii*) estén integrando diferentes clados indica que la habilidad de producir aflatoxinas fue perdida ( o ganada) varias veces durante la evolución



(Varga *et al.*, 2003). Los hongos productores de aflatoxinas son un mosaico de especies que pertenecen a diferentes clados y en *A. flavus* los aislamientos toxigénicos como los no-toxigénicos son parafiléticos (incluyen una parte pero no a todos los descendientes de un ancestro dado) dejando por lo tanto incompleta la historia evolutiva (Cotty *et al.*, 1994; Tran-Dinh *et al.*, 1999).

Entre las especies productoras de aflatoxinas, *A. flavus* es una de las especies más comúnmente implicada como agente causal de contaminación con aflatoxinas (Bayman & Cotty, 1993) y es la especie toxigénica dominante en maní (Hill *et al.*, 1985; Horn *et al.*, 1994).

**Tabla 2.** Clasificación del género *Aspergillus*, teleomorfos asociados, según Gams *et al.* (1985), y Peterson (2000).

Sección	Subgénero		Teleomorfo asociado
	Gams <i>et al.</i> <sup>a</sup>	Peterson <sup>b</sup>	
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Restricti</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Cervini</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Terrei</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Flavipedes</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Nigri</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Neopetromyces</i>
<b>Flavi</b>	<b>Circumdati</b>	<b>Aspergillus</b>	<b>Petromyces</b>
<i>Cremeri</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetosartorya</i>
<i>Candidi</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i>	-
<i>Wentii</i>	<i>Circumdati</i>	-	-
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neocarpenteles</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>
<i>Versicolores</i>	<i>Nidulantes</i>	-	-
<i>Usti</i>	<i>Nidulantes</i>	-	-
<i>Sparsi</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Nidulantes</i>	-
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Sclerocleista</i>
Grupo <i>Warcupiella</i>	<i>Ornati</i>	Grupo <i>Warcupiella</i>	<i>Warcupiella</i>

**Tabla 3.** Especies que integran la sección *Flavi*, de acuerdo a Varga *et al.* (2003).

Especie de <i>Aspergillus</i> y <i>Petromyces</i>	Clado	Capacidad toxigénica <sup>a</sup>
<i>A. robustus</i>	-	-
<i>A. leporis</i>	-	-
<i>A. avenaceus</i>	-	-
<i>A. lanosus</i>	" <i>P. alliaceus</i> "	-
<i>P. alliaceus</i>	" <i>P. alliaceus</i> "	-
<i>P. albertensis</i>	" <i>P. alliaceus</i> "	-
<i>A. bombycis</i>	-	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. nomius</i>	-	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. oryzae</i>	" <i>A. flavus</i> "	CPA, ácido kojico
<i>A. subolivaceus</i>	" <i>A. flavus</i> "	-
<i>A. flavus</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, CPA, ácido kojico
<i>A. thomii</i>	" <i>A. flavus</i> "	-
<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	" <i>A. flavus</i> "	-
<i>A. parasiticus</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. toxicarius</i>	" <i>A. flavus</i> "	AFB, AFG, ácido kojico
<i>A. sojae</i>	" <i>A. flavus</i> "	ácido kojico
<i>A. caelatus</i>	" <i>A. tamarii</i> "	ácido kojico
<i>A. pseudotamarii</i>	" <i>A. tamarii</i> "	AFB, CPA, ácido kojico
<i>A. coremiiformis</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. flavofurcatus</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. terricola</i> var. <i>indica</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. terricola</i>	" <i>A. tamarii</i> "	-
<i>A. tamarii</i>	" <i>A. tamarii</i> "	CPA, ácido kojico

<sup>a</sup>AFB: aflatoxina tipo B; AFG: aflatoxina tipo G; CPA: ácido ciclopiazonico.

## 1.5 *Aspergillus flavus*

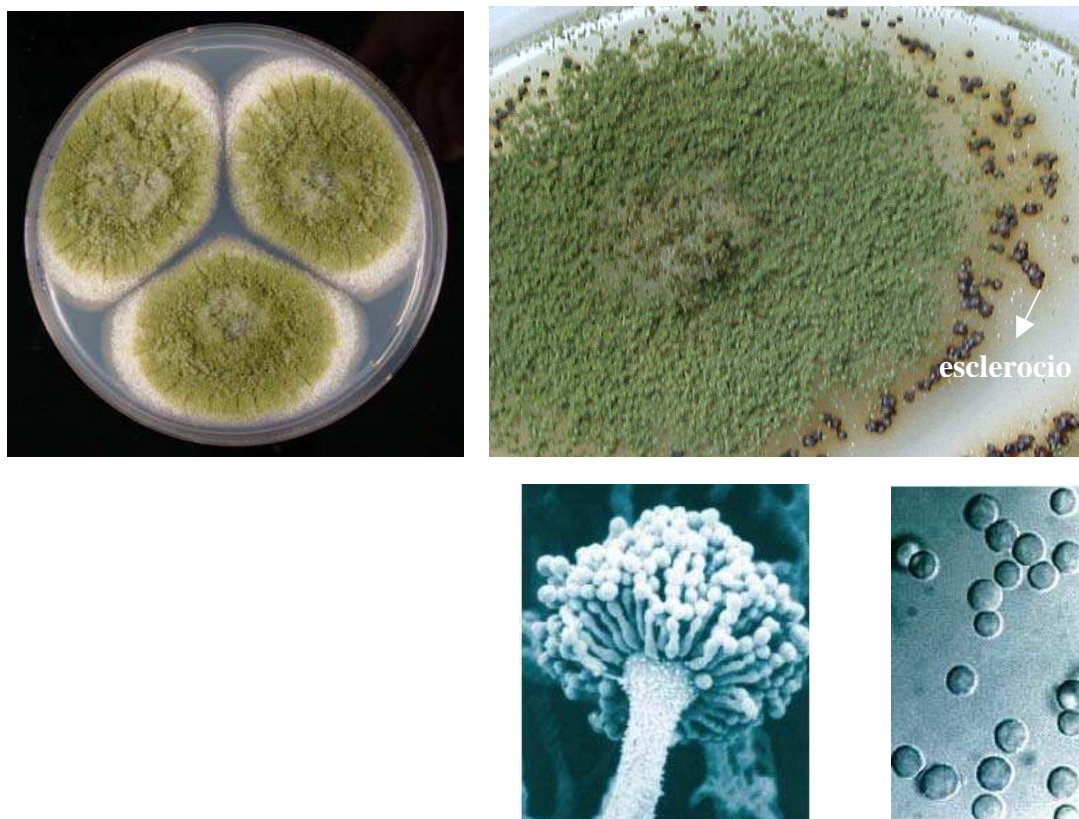
### 1.5.1 Descripción y biología

*A. flavus* presenta cabezuelas conidiales predominantemente metuladas de color verde amarillento volviéndose verde oliváceas a la madurez. Los estípites generalmente tienen una longitud entre 400 y 1000µm, incoloros, con pared rugosa; vesículas esféricas de 20 - 45µm de diámetro, fértil en el 75% de su superficie; métulas y fialides similares en tamaño; conidios esféricos o subesféricos, usualmente de 3.5 – 5µm de diámetro, con paredes relativamente delgadas y finamente rugosas. Los aislamientos pueden crecer a 42°C pero no a 5°C, siendo la temperatura óptima de crecimiento entre 35 - 37°C y la de producción de aflatoxinas 25°C. Xerofílico, puede crecer desde 0.78 a 33°C siendo 0.95 la actividad de agua óptima para su crecimiento y producción de aflatoxinas. Teleomorfo desconocido (Singh *et al.*, 1991; Pitt & Hocking, 1997) (Fig. 2). Una característica importante de *A. flavus* es que presenta conidios multinucleados (2-3 núcleos por conidio)

(Yuill, 1950), pudiendo conferirle mayor viabilidad y resistencia a condiciones adversas (Kazumoto *et al.*, 2005).

Otra característica importante dentro de la especie *A. flavus*, relacionada con la capacidad de supervivencia y dispersión del hongo en el medio ambiente, es la capacidad de producir esclerocios (Fig. 2). Dentro de la variación fenotípica encontrada para los aislamientos de esta especie, se han podido establecer dos tipos de cepas. Las denominadas cepas S son productoras de alto número de pequeños esclerocios (< 400 µm de diámetro) y generalmente producen grandes cantidades de aflatoxinas (Cotty, 1989). Estos aislamientos han sido referidos como atípicos (Saito *et al.*, 1986), también denominados como *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* Saito & Tsuruta (Saito & Tsuruta, 1993) y establecidos como especie *A. parvisclerotigenus* (Saito & Tsuruta) Frisvad & Samson (Frisvad *et al.*, 2005). Las cepas L producen esclerocios grandes (> 400 µm de diámetro) en bajo número, y en promedio menor concentración de aflatoxinas (Saito *et al.*, 1986; Cotty, 1989; Bayman & Cotty, 1993). En Tailandia, Australia, Bénin y Argentina se han aislado cepas S productoras de aflatoxinas tipo B o productoras de ambos tipos de aflatoxinas (B y G) (Hesseltine *et al.*, 1970; Saito *et al.*, 1986; Blaney *et al.*, 1989; Cotty & Cardwell, 1999; Vaamonde *et al.*, 2003), mientras que en Estados Unidos solamente han sido reportadas cepas S productoras de aflatoxinas B (Cotty & Cardwell, 1999; Horn & Dorner, 1999).

**Figura 2.** Colonia de *A. flavus*, esclerocios, cabezuelas y conidios.



Estudios moleculares realizados con cepas de *A. flavus* de diversa procedencia geográfica (Geiser *et al.*, 1998; Tran-Dinh *et al.*, 1999; Geiser *et al.*, 2001) indican que las cepas S productoras de aflatoxinas de tipo B y G y CPA forman un subgrupo que por sus características genéticas, morfológicas y bioquímicas deba ser posiblemente reconocido como una nueva especie. Geiser *et al.* (2001) sostienen la hipótesis de que *A. flavus*, como está definido en la actualidad, representa un grupo parafilético, con especies crípticas (morfológicamente indistinguibles) incluyendo al menos dos grandes grupos de aislamientos (I y II) que muestran evidencia de una larga historia de aislamiento reproductivo.

Numerosas observaciones apoyan la hipótesis de que en *A. flavus* la producción de metabolitos secundarios, la conidiogénesis y la formación de esclerocios están íntimamente relacionados. Wicklow y Shotwell (1983) postulan que probablemente las aflatoxinas tengan una función correlacionada con los esclerocios y que la biosíntesis de aflatoxinas y morfogénesis de los esclerocios están interrelacionadas. Además, Adams *et al.*, (1998)

observaron que ciertos pasos de la regulación de la conidiogénesis están correlacionados con la formación de esterigmatocistina, conocido precursor de las aflatoxinas.

Las especies de la sección *Flavi* más similares morfológicamente a *A. flavus* son *A. parasiticus* y *A. nomius*. Este último 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 crecimiento (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).

*A. flavus* y *A. parasiticus*, al igual que otras especies de la sección, están frecuentemente asociados con productos vegetales, particularmente maní, maíz, algodón y nueces, cultivados en áreas de clima tropical y subtropical (Diener *et al.*, 1987). El estrés hídrico acompañado por temperaturas elevadas durante el desarrollo de la semilla promueve la invasión por *A. flavus* y subsecuente contaminación de las semillas con aflatoxinas (Hill, *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1980; Klich *et al.*, 1984).

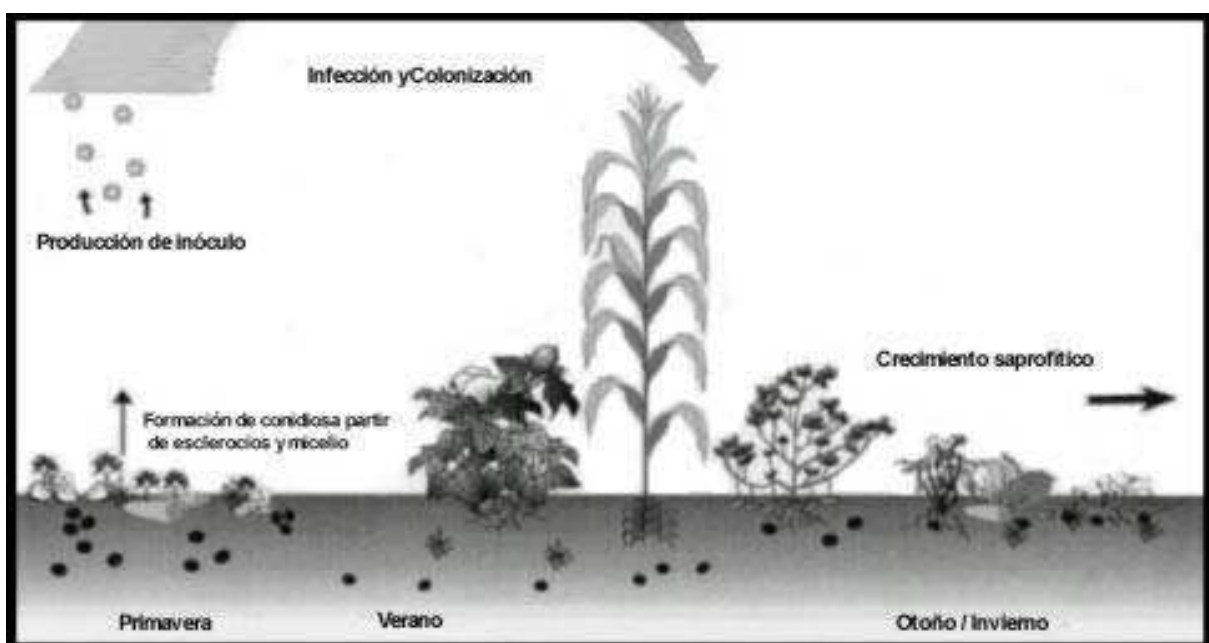
El ciclo de vida de *A. flavus* tiene como potenciales fuentes de inóculo primario a los conidios desarrollados a partir de los esclerocios esporogénicos que permanecen en el suelo como estructuras de resistencia (Wicklow, 1983). Estos esclerocios que fueron dispersados durante la cosecha permanecen en el suelo durante el invierno produciendo conidióforos y conidios en primavera. Los conidios son diseminados por el aire y por insectos hacia las partes florales y hojas de los cultivos constituyendo una fuente de inóculo secundario (Fig.3) (Diener *et al.*, 1987).

Los primeros estudios sobre la invasión de semillas susceptibles a *A. flavus* indicaban que la infección principalmente ocurría en la poscosecha, siendo los más afectados aquellos granos almacenados en condiciones inadecuadas de secado, pero trabajos más recientes establecen que la principal invasión se da en el campo antes de la cosecha (Pitt & Hocking, 1997). En el maní, el principal modo de infección es a través de semillas y legumbres dañadas, aunque la infección inicial puede ocurrir a través del ginóforo y en el ovario sin generar aparente daño a los embriones (Wells & Kreutze, 1972; Hill *et al.*, 1983; Blankenship *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 2000).

La habilidad de *A. flavus* para crecer en un amplio rango de temperaturas de almacenamiento y crecer a bajas actividades de agua hacen que resulte difícil de imaginar

una *commodity* en donde este hongo no sea capaz de crecer si las condiciones durante la precosecha, poscosecha y almacenamiento no son las adecuadas. Pero es esencial diferenciar entre la posibilidad de crecimiento y la de producir aflatoxinas, ya que la contaminación de los productos con aflatoxinas es la causante de pérdidas económicas debido a los controles por su elevada toxicidad.

**Figura 3.** Diagrama de la infección pre-cosecha por *A. flavus* en algodón, maíz y maní (Wicklow, 1983).



## 1.5.2 Toxinas

### 1.5.2.a Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios con una alta actividad biológica, producidos en la naturaleza sólo por algunos miembros de la sección *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis* y *A. pseudotamarii*). Las cuatro aflatoxinas principales producidas naturalmente son B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Las letras B y G se refieren a los colores fluorescentes azul (*blue*) y verde (*green*) producidos por estos compuestos bajo la luz UV en las placas de cromatografía delgada, mientras que los subíndices 1 y 2 se refieren al patrón de separación en las placas cromatográficas. Cuando las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son ingeridas por vacas lecheras, una proporción de alrededor del 1% es hidrolizada y excretada



en leche como aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, que son compuestos de menor toxicidad que las moléculas predecesoras pero de gran importancia por el consumo de leche de vaca por infantes. Debido a su alta toxicidad, en la mayoría de los países se han establecido bajos límites para aflatoxinas en alimentos para humanos y animales (ICMSF, 1996).

Estructuralmente las aflatoxinas son derivados de las difuranocumarinas (Büchi & Rae, 1969), contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de las aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en las aflatoxinas G. Las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> son el producto metabólico hidroxilado de las B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Fig. 4). Las aflatoxinas son tóxicas tanto en forma aguda como crónica en animales y el hombre. Producen distintos efectos, tales como daño agudo en el hígado, cirrosis, inducción de tumores y teratogénesis. (Stoloff, 1977). Quizás la mayor importancia de las aflatoxinas en la salud humana son sus efectos inmunosupresores, ya sea solas o en combinación con otras micotoxinas (Pier, 1991). Se ha demostrado que la aflatoxina B<sub>1</sub> es el más potente carcinógeno hepático en varias especies animales. El cáncer de hígado humano tiene una alta incidencia en Asia central y partes del sudeste de Asia, y estudios en varios países de Africa y Tailandia mostraron una correlación entre el logaritmo de la ingesta de aflatoxinas y la ocurrencia de cáncer de hígado humano (van Rensburg, 1977). La carcinogenicidad en animales es tan alta que debe realizarse todo esfuerzo posible para monitorear los niveles en alimentos humanos y para reducirlos lo más posible.

La síntesis de aflatoxinas no tiene una función evidente en el crecimiento primario y el metabolismo de los organismos, por lo cual es considerado un proceso secundario. Si bien el rol biológico de las aflatoxinas en la supervivencia ecológica del microorganismo fúngico aún hoy es motivo de controversia, se sugiere que tienen un valor adaptativo. Se incluyen hipótesis de que las aflatoxinas tienen como función remover el exceso de acetato cuando el hongo crece en sustratos ricos en fuente de carbono, la protección del hongo contra competidores o insectos predadores y la promoción de la formación de conidios y esclerocios (Bu'Lock, 1965; Drummond & Pinnock, 1990; Calvo *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2004).

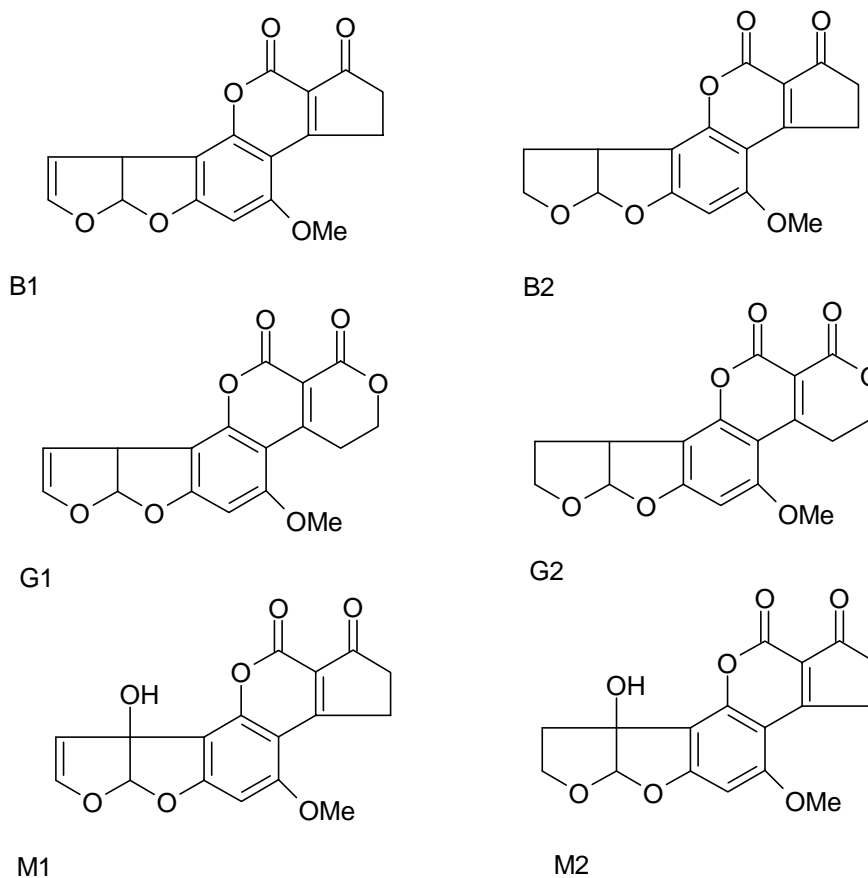
El modo de acción, metabolismo y biosíntesis de las aflatoxinas ha sido extensamente estudiado. Las aflatoxinas son producidas por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina a partir de un precursor policetónico (Klich & Cleveland, 2000).

Las aflatoxinas B se consideraron como precursoras de la biosíntesis de las aflatoxinas G, pero estudios recientes demostraron que la formación de las aflatoxinas G es independiente de la formación de las B (Yabe *et al.*, 1999). Varias enzimas específicas asociadas con conversiones de precursores en el camino de biosíntesis han sido parcialmente purificadas. Estudios genéticos demostraron que la biosíntesis de aflatoxinas es un proceso altamente complejo gobernado por 23 genes agrupados en un cluster en una región de 75 kilobases del ADN (Ehrlich *et al.*, 2003). La regulación de la transcripción es controlada por una proteína codificada por el gen *aflR*. Los efectos de posición cromosomal, así como un gran número de otros genes reguladores están sujetos al control nutricional y ambiental (Yu *et al.*, 2002).

El control de las aflatoxinas en materias primas generalmente se basa en técnicas de *screening* que separan las nueces, granos o semillas afectados. En maíz, algodón e higos la examinación se realiza bajo la luz UV: aquellas partículas que fluorescen pueden estar contaminadas. Pero como el maní fluoresce bajo la luz UV por sí solo, la selección se realiza por máquinas electrónicas de selección por color que detectan maníes deteriorados (Pedelini & Casini, 1998).

Las aflatoxinas pueden ser parcialmente destruidas por varios tratamientos químicos. El método químico más práctico para la destrucción de aflatoxinas parece ser el uso de gas de amonio anhidro a elevadas temperaturas y presiones, con un 95 al 98% de reducción en aflatoxinas totales (Smith & Moss, 1985; Van Egmond, 1991). En materias primas, el método más efectivo de control, especialmente en maní, es la prevención de la contaminación de las plantas con cepas de hongos aflatoxigénicos.

Las aflatoxinas son una de las pocas micotoxinas cubiertas por la legislación. En varios países se imponen límites estatales sobre la cantidad de aflatoxinas que pueden estar presentes en ciertos alimentos. El límite impuesto para los países de occidente varía en general entre 5 y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para aflatoxina B<sub>1</sub> en varios alimentos para humanos, incluyendo maní y derivados del maní, con cantidades variables en alimentos para animales, pero hasta 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  permitido en alimentos para ganado vacuno y ovino en los Estados Unidos (Gilbert, 1991). En la Argentina el límite impuesto para aflatoxinas en leche, granos y derivados para consumo humano es de 0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$  y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente.

**Figura 4.** Estructura química de las aflatoxinas.

### 1.5.2.b Acido ciclopiazónico

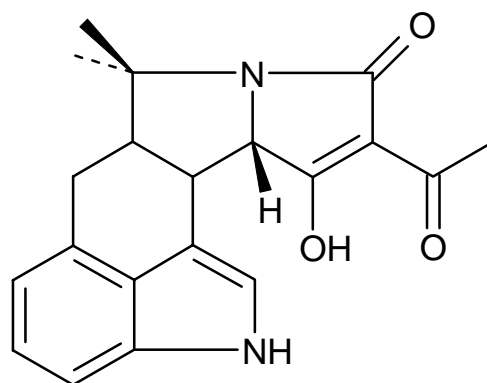
El ácido ciclopiazónico (CPA) es un compuesto producido por varios hongos, su potencial importancia como un contaminante natural de alimentos se evidenció en productos agrícolas que se utilizan para la producción de alimentos fermentados. Los hongos productores de CPA incluyen *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. tamarii*, varias especies de *Penicillium* y *A. oryzae*. Hay evidencias de que el CPA ha estado involucrado, junto con las aflatoxinas, en la enfermedad X de los pavos (*Turkey "X" disease*) (Rao & Husain, 1985; Cole, 1986; Bradburn *et al*, 1994).

El CPA es un ácido indol-tetrámico, que forma complejos con iones metálicos (Scott, 1992). Posee una  $\beta$ -dicetona y una  $\beta$ -hidroxi  $\alpha$ ,  $\beta$ -cetona insaturada, con evidencia de ser este último grupo el responsable de su actividad quelante (Fig. 5). Su rol en la salud humana aún no ha sido dilucidado, un caso de intoxicación en la India es el único dato documentado de sus efectos en humanos y la sintomatología observada fueron náuseas y

mareos (Rao & Husain, 1985). Sin embargo, la evidencia de su influencia en enfermedades animales es fuerte (Cole, 1986). Los efectos biológicos del CPA incluyen anorexia, diarrea, pirexia, deshidratación, pérdida de peso, ataxia, inmovilidad y espasmos al morir (Purchase, 1971; Dorner *et al.*, 1983; Nuehring *et al.*, 1985; Cullen *et al.*, 1988).

Finalmente, como el CPA es producido por cepas de *A. flavus*, también productoras de aflatoxinas, debe considerarse la posibilidad de un efecto sinérgico cuando ambas micotoxinas son producidas en el mismo alimento.

**Figura 5.** Estructura química del ácido ciclopiazónico.



### 1.5.2.c Otras toxinas

*A. flavus*, además de producir aflatoxinas y CPA, es capaz de producir otras micotoxinas de menor importancia, algunas de las cuales tienen propiedades antibióticas y otras han sido clasificadas como compuestos tóxicos. Las cepas de *A. flavus* pueden producir esterigmatocistina que es tóxica en cultivos celulares y tiene propiedades carcinogénicas. Además, son capaces de producir fumigatina que puede actuar como antibiótico contra bacterias. Otras micotoxinas conocidas son el ácido aspergílico y el aflatrem, que son compuestos tóxicos para ácaros (Sharma & Salunkhe, 1991).

El conocimiento del perfil de producción de estas otras micotoxinas por parte de *A. flavus* contribuye al conocimiento de la especie, ya que de esta manera se puede identificar correctamente a los hongos y ayudar a la prevención de contaminación de los alimentos. La quimiotaxonomía constituye una herramienta muy eficaz para la identificación de especies fúngicas y su control (Cole & Cox, 1981; Sharma & Salunkhe, 1991; Frisvad *et al.*, 2005).

## 1.6 Prevención de *Aspergillus* y sus micotoxinas en los cultivos

La asociación entre contaminación con micotoxinas y un inadecuado almacenamiento de los granos ha sido reconocida desde hace mucho tiempo. Sin embargo, se ha demostrado que la contaminación con micotoxinas también es muy importante durante la pre-cosecha, y es por esta razón que actualmente gran parte de las investigaciones están orientadas al control de micotoxinas en el campo (Cleveland *et al.*, 2003).

El mantenimiento de buenas prácticas culturales y de manejo que promuevan el correcto desarrollo de los cultivos puede reducir, pero no eliminar, la contaminación pre-cosecha con micotoxinas. En maní, la irrigación previene la contaminación con aflatoxinas, debido a que las plantas no están sometidas a estrés hídrico que induce la formación de estas micotoxinas. Sin embargo, no siempre es posible llevar a cabo estas prácticas debido a los costos de producción, localización geográfica o la naturaleza del sistema de producción del cultivo. Por lo tanto es necesario implementar nuevas estrategias para limitar la contaminación en el campo con aflatoxinas (Cleveland *et al.*, 2003).

Una de las medidas de control puede ser a través de la incorporación de resistencia antifúngica a los cultivos. Para maíz, el cultivo donde más ampliamente se ha estudiado esta práctica de control, la estrategia que ha ganado más importancia es la de incrementar la resistencia a la contaminación de aflatoxinas a través de técnicas de mejoramiento genético, como es la cruce de líneas resistentes con susceptibles (Brown *et al.*, 1998). Otra práctica para prevenir la entrada de hongos aflatoxigenicos en los cultivos es controlando a los insectos. Los insectos han sido implicados frecuentemente como vectores de hongos y causantes de heridas que permiten su entrada al tejido vegetal (Dowd, 1998). El control se basa en nuevos insecticidas con diferentes formas de aplicación, plantas resistentes a insectos y programas de manejo integrado (Cleveland *et al.*, 2003).

Una de las estrategias más importantes para reducir la contaminación de los cultivos con aflatoxinas es el control biológico de los hongos toxigénicos (Cleveland *et al.*, 2003). Esta práctica utiliza la aplicación de cepas no productoras de aflatoxinas (cepas atoxigénicas) que por competencia excluyen a las cepas productoras de aflatoxinas (cepas toxigénicas) del ambiente agrícola (Cotty, 1994). Esta técnica ha sido utilizada en *A. flavus* y *A. parasiticus* en maíz, algodón y maní, pero solamente está aprobada como biopesticida

para algodón (Brown *et al.*, 1991; Dorner *et al.*, 1992; Cotty, 1994; Dorner *et al.*, 1999; Bock & Cotty, 1999). Otro ejemplo de control biológico es el uso de levaduras aisladas de los cultivos donde conviven con *A. flavus*, capaces de inhibir su crecimiento y la biosíntesis de aflatoxinas (Hua *et al.*, 1999). La aplicación de estas estrategias requiere el conocimiento previo de las características de las poblaciones autóctonas de *A. flavus*, especialmente en relación a su capacidad invasiva y su potencial toxigénico.

El conocimiento de la variabilidad genética y la estructura de las poblaciones de *A. flavus* presentes en los cultivos es uno de los estudios más necesarios para lograr un manejo efectivo de la contaminación de los cultivos con hongos aflatoxigénicos y micotoxinas (Bayman & Cotty, 1993; Horn *et al.*, 1996). Geiser *et al.* (1998) sugirieron que la recombinación tiene importantes implicancias en las estrategias de control biológico, particularmente en aquellas que involucran cepas atoxigénicas debido al potencial de cruzamiento entre las cepas nativas y las introducidas. El estudio de la compatibilidad vegetativa puede ser de gran importancia en este caso ya que, basado en las barreras de incompatibilidad vegetativa, el potencial para el intercambio genético puede ser mucho mayor entre aislamientos pertenecientes a un mismo grupo de compatibilidad que entre aislamientos de diferentes grupos.

## **2. COMPATIBILIDAD VEGETATIVA**

### **2.1 *Mating Type* y Compatibilidad Vegetativa**

En los Ascomycetes filamentosos, *mating type* y compatibilidad vegetativa (VC) confieren reconocimiento del individuo y entre individuos de una misma especie en las fases sexual y vegetativa, respectivamente. La mayoría de los Ascomycetes filamentosos son haploides y existen primariamente como individuos con reproducción vegetativa, pero condiciones ambientales adversas pueden desencadenar el paso a la reproducción sexual (Glass & Kulda, 1992). 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, ésta 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 (Alexopoulos *et al.*, 1996).

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 y por lo tanto genera diversidad genética (Alexopoulos *et al.*, 1996). En algunas especies, como en *Neurospora crassa* Shear & Dodge, los genes del *mating-type* también controlarían, en parte, la VC.

La variabilidad intraespecífica en los hongos, no está restringida a la reproducción sexual. La heterocariosis y la parasexualidad (recombinación mitótica o somática) son dos procesos importantes en la variabilidad de la especie, en particular en las formas anamórficas, que carecen de reproducción sexual (Glass, *et al.*, 2000). *A. nidulans* fue el primer organismo en donde se demostró la existencia del ciclo parasexual, donde la recombinación puede tener lugar sin la ocurrencia de reproducción sexual (Pontecorvo, 1956). Estudios posteriores demostraron que la recombinación mitótica en *A. niger* es 100 veces mayor que en *A. nidulans* y que en *A. flavus* el proceso de parasexualidad también está presente (Lhoas, 1967; Papa, 1973). Se conoce además que en *A. nidulans* la recombinación mitótica es 500 veces menor que la recombinación meiótica, y que en la naturaleza la mayoría de los aislamientos son haploides, con 0.01-0.1% de diploides (Upshall, 1981). En un micelio en crecimiento los núcleos haploides se fusionan para formar diploides vegetativos con una probabilidad de 6/10 y el núcleo diploide continúa con una haploidización espontánea con una probabilidad de 2/10 por mitosis (Kafer, 1961).

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; Glass & Kulda, 1992). 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 heterocarionte tiene ventajas adaptativas similares a las de un diploide, pero donde todos los genes de ambos núcleos pueden expresarse (Glass *et al.*, 2000). El primer evento necesario para que la recombinación parasexual ocurra es la fusión de dos núcleos diferentes para producir el núcleo diploide, luego en este núcleo debe producirse *crossing over* en la mitosis y por último haploidización por aneuploidia (pérdida gradual de cromosomas hasta la restauración del haploide recombinante) (Alexopoulos *et al.*, 1996; Hocart *et al.*, 1993).

La formación del heterocarionte está regulada por sistemas genéticos alélicos y no alélicos. Estos dos sistemas tienen en común que la incompatibilidad es elicitada cuando existe una diferencia genética específica entre dos cepas. Conceptualmente el sistema más simple es el alélico, en el cual cepas idénticas en un particular set de locus, denominados *het* o *vic*, son capaces de formar un heterocarionte estable, mientras que aquellas que difieren en alguno de esos locus son incapaces de formar el heterocarionte. Las interacciones no alélicas son aquellas en las cuales los alelos de un locus interactúan con alelos del segundo locus para bloquear la formación del heterocarionte estable. Las especies del género *Aspergillus* estudiadas hasta el momento presentan una regulación alélica (Glass & Kulda, 1992; Leslie, 1993).

Estudios genéticos en Ascomycetes demostraron que el número de locus *het* varía entre 5 y 11, dependiendo de la especie, y se encuentran distribuidos entre grupos de ligamiento; en *A. nidulans* y *A. flavus* existen 8 locus con múltiples alelos que regulan la VC y por lo tanto la formación del heterocarionte, en *A. flavus* los locus *het* están dispuestos en cinco grupos de ligamiento (Papa, 1973; Glass & Kulda, 1992). Los locus *het* codifican para múltiples productos, algunos relacionados solamente con la VC y otros involucrados además en otros procesos celulares (Glass & Kaneko, 2003). El mecanismo molecular asociado con la formación del heterocarionte sugiere que a partir de la polimorfía de los alelos de los locus *het* se forman proteínas *HET* diferentes estructuralmente que interactúan y modifican productos controlando la VC (Saupe & Glass, 1997).



La incompatibilidad vegetativa y la parasexualidad han sido propuestas, junto con la clonalidad, como mecanismos para explicar el fenómeno de especiación en organismos con reproducción asexual (Kohn, 2005). Claramente existe un componente clonal muy fuerte en la historia evolutiva de *A. flavus*. Sin embargo, la falta de concordancia de genealogías entre diferentes genes puede ser razonablemente explicado solamente por recombinación entre estos locus (Geiser *et al.*, 1998). Si bien hasta el momento no se conoce cómo *A. flavus* y otros hongos asexuales recombinan, la diversidad genética puede ser explicada por medio de parasexualidad, intercambio meiótico en el pasado o la presencia de un estado sexual no detectado (Geiser *et al.*, 1998; Varga *et al.*, 2003).

## **2.2 Parasexualidad. Ventajas adaptativas**

Inmediatamente después del descubrimiento de Pontecorvo (1956), la utilidad del ciclo parasexual en análisis genéticos fue rápidamente reconocida, apareciendo como una alternativa a la recombinación sexual. Este entusiasmo del rol del ciclo parasexual en evolución fue reemplazado por el escepticismo al informarse que la heterocariosis es un proceso que rara vez ocurre en la naturaleza debido a que la anastomosis entre diferentes micelios es regulada por la ocurrencia de incompatibilidad somática (Glass *et al.*, 2000).

La pregunta sobre si un organismo haploide tiene ventajas adaptativas sobre uno diploide, y viceversa, ha sido motivo de diversos estudios teóricos y experimentales (Crow & Kimura, 1965; Orr & Otto, 1994; Perrot *et al.*, 1991; Paquin & Adams, 1983; Adams & Hansche, 1974). Los modelos teóricos postulan que los efectos fenotípicos de mutaciones recesivas están enmascaradas parcialmente en los diploides. De esta manera el diploide se ve favorecido a corto plazo en el caso de mutaciones deletéreas, pero se ve desfavorecido en el caso de mutaciones recesivas adaptativas. Los organismos haploides, por su parte, pueden evolucionar rápidamente debido a la inmediata expresión de mutaciones adaptativas (al menos en poblaciones asexuales), sin embargo un núcleo diploide contiene el doble de ADN que uno haploide lo cual sugiere una tasa alta de mutaciones por núcleo, dando una ventaja cuando la cantidad de mutaciones es limitante de la adaptación.

En un micelio fúngico las mutaciones recesivas pueden acumularse en núcleos vegetativos diploides y pueden segregarse como recombinantes por procesos parasexuales. Si muchas mutaciones recesivas interactúan para producir genotipos particularmente bien

adaptados, entonces, el ciclo parasexual puede ser mas eficiente que el ciclo sexual, en donde la fase diploide es muy corta y presumiblemente muy poca selección puede tener lugar.

Schoustra (2004) con su estudio sobre la adaptación de *A. nidulans* a ambientes nuevos y su relación con la parasexualidad permite dejar de lado el escepticismo sobre rol de la parasexualidad en los procesos evolutivos. Luego de un estudio experimental de adaptación sobre 3000 generaciones mitóticas con haploides isogénicos y cepas diploides demostró que el ciclo parasexual promueve la adaptación a nuevos ambientes. Este autor propone que el ciclo parasexual permite al organismo explotar y extender la fase diploide vegetativa, acumulando mutaciones recesivas que durante la subsiguiente haploidización generarán recombinantes altamente competitivos.

### **2.3 La heterocariosis en el estudio de hongos patogénicos**

La utilización de la heterocariosis como herramienta de estudio de hongos se efectúa principalmente en estudios poblaciones en los cuales la VC representa un marcador polimórfico. Pero la VC también es utilizada como modelo de auto-reconocimiento y entre otros individuos, en la construcción de mapas genéticos, y agentes antifúngicos (Leslie, 1996). De esta manera, además de su significativa importancia genética en la naturaleza, la heterocariosis puede ser utilizada como herramienta en el laboratorio.

La mayoría de los estudios con VC utilizan el modelo propuesto por Puhalla (1985), donde se sugiere que la VC puede ser utilizada para subdividir poblaciones entre diferentes grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) y estas subdivisiones pueden estar correlacionadas con la patogenicidad. Este modelo asume que el patógeno raramente participa en eventos de recombinación que pueden brindar un reorganización de los alelos *vic* para dar nuevos fenotipos de VCG , y además asume que un VCG es esencialmente un clon. 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 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).

La técnica para utilizar la heterocariosis como herramienta de laboratorio se basa en la observación directa de la formación o no del heterocarionte y sus características en *tests* de complementación (Beadle & Coonradt, 1944). 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 la práctica, los *tests* de formación de heterocariontes usualmente utilizan marcadores de auxotrofia o de pigmentación para facilitar la detección visual de la colonia heterocarionte y distinguirla de la de sus componentes. La técnica desarrollada por Cove (1976a; 1976b) para *Aspergillus* es relativamente simple y se basa en la utilización de mutantes deficientes en la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno (*nit*). El establecimiento del heterocarionte prototrófico en condiciones en las cuales ninguno de los dos componentes auxotróficos pueden desarrollarse bien indica que dos cepas pertenecen al mismo VCG (Leslie, 1993).

El agrupamiento de cepas en VCGs ha sido utilizado por los fitopatólogos para identificar razas, *formae speciales*, rango de hospedantes y grupos de patogenicidad. (Puhalla 1985; Correll *et al.*, 1987; Katan & Katan, 1988; Katan *et al.*, 1989). *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. es uno de los organismos donde la VC ha sido ampliamente aplicada a nivel mundial, se ha logrado demostrar la fuerte correlación entre patogenicidad y VCG en muchas *formae speciales* de esta especie y establecer linajes clonales a partir de aislamientos de varias partes del globo y homogeneizar nomenclaturas de VCGs de manera conjunta entre distintos países, lo que permite obtener un índice de diversidad genética y monitorear la dinámica de las poblaciones entre distintos países a través de los VCGs (Leslie, 1996; Koenig, *et al.*, 1997; Hiemstra & Guranowska, 2003).

Otro ejemplo clásico del uso de VC es el de *Endothia parasitica* (Murr.) And. también conocida como *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, agente etiológico del marchitamiento del castaño (*Chesnut Blight*), el cual presenta cepas hipovirulentas que a

través de anastomosis de las hifas diseminan un factor de hipovirulencia que debilita y reduce la virulencia de las cepas más agresivas, el reconocimiento de la variabilidad genética de las poblaciones del patógeno y la capacidad de las cepas para diseminar el factor de hipovirulencia en la población son características extremadamente importantes en el uso de la hipovirulencia como biocontrolador (Anagnostakis & Kranz, 1987; Causin *et al.*, 1995).

#### **2.4 Estudios de Compatibilidad vegetativa en *Aspergillus flavus***

En varias especies del género *Aspergillus* los *tests* de VC han sido clarificadores de relaciones genéticas entre individuos. El primer estudio de VC de las poblaciones de *A. flavus* fue realizado por Papa (1986) en una población de *A. flavus* de maíz. Bayman y 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.

Horn y Greene (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, se determinó una asociación entre caracteres morfológicos y la producción de aflatoxinas con respecto a los VCGs hallados (Horn *et al.*, 1996).

En Argentina los estudios de VC están restringidos a las poblaciones de *A. flavus* en campos de maní de la provincia de Córdoba. El primer trabajo donde se utilizó la técnica de VC fue el realizado por Novas y Cabral (2002) donde se establecieron 13 VCGs a partir de 25 cepas de *A. flavus* aisladas de semillas de maní. Otro estudio, también en la provincia de Córdoba, permitió establecer 56 VCGs para la población de *A. flavus* de suelo de áreas cultivadas con maní (Barros, *et al.*, 2005). Si bien la provincia de Córdoba es el

núcleo de producción de maní en nuestro país es necesario analizar la diversidad genética de otras provincias donde se cultiva maní, como también lograr obtener una caracterización de todas las zonas agroecológicas donde se produce esta leguminosa en conjunto.

Los VCGs son un efectivo marcador multilocular particularmente útil en la caracterización de la estructura poblacional de *A. flavus*, permitiendo una evaluación multigénica directa de una cualidad de importancia adaptativa dentro de las poblaciones fúngicas (Leslie, 1996). Sin embargo, los análisis de VC no son apropiados para determinar si dos cepas pertenecen o no a la misma especie biológica o para evaluar diferencias por encima del nivel de especie (Leslie, 1996), para esto es necesario recurrir por ejemplo a otras técnicas moleculares como la secuenciación de genes altamente conservados.

### **3. SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA**

#### **3.1 Inferencia filogenética**

La comprensión de las relaciones evolutivas entre los individuos constituye uno de los puntos de partida para la sistemática y la taxonomía. Dichas relaciones son representadas en un árbol jerárquico llamado cladograma. Un árbol es un algoritmo matemático que se utiliza para modelar las relaciones evolutivas de un grupo de organismos, inferidas, en el caso de los caracteres moleculares a partir de secuencias de ADN, ARN o proteínas de cada uno de ellos. La representación gráfica de un árbol consiste en nodos conectados por ramas. Los nodos son las unidades taxonómicas operacionales (OTUs, del inglés *operative taxonomic units*) y pueden ser tanto terminales como internos. Los nodos terminales del árbol representan las secuencias de ancestro hipotéticos, de los que obviamente no se tienen datos. El ancestro hipotético de todas las OTUs constituye la raíz del árbol, aunque no siempre los datos disponibles permiten definirlo (Goloboff, 1998).

Existen dos grandes escuelas conceptuales de la sistemática. La escuela fenética, donde se construyen árboles con el mayor número de caracteres comparables posibles estableciendo la afinidad de las OTUs según la similitud general que tengan. En esta metodología los agrupamientos reflejan el parecido global entre las OTUs aunque,

dependiendo del tipo de caracteres y de su modo de evolución, los árboles que resultan no necesariamente representan las relaciones evolutivas. La otra corriente, la escuela cladista, se propone construir árboles en base a las relaciones ancestro-descendiente entre los organismos. El análisis cladista busca inferir la historia real a través de características particulares conocidas como rasgos derivados compartidos (sinapomorfias). Existe una fuerte discusión entre las corrientes fenética y cladista. En ciertos casos la escuela fenética es de mayor utilidad por su resolución y número de árboles, mientras que el cladismo tiene bases lógicas y filosóficas más sólidas, presentando relativa objetividad durante el proceso de reconstrucción filogenética. La objetividad es relativa, ya que no hay un método único para la construcción de cladogramas, por lo que el investigador debe elegir cuál usar, y en algunos casos, puede haber diferencias en la topología obtenida, según sea el método utilizado (Goloboff, 1998).

### **3.2 Caracteres moleculares en filogenia**

Cuando se estudian organismos muy relacionados entre sí y la variabilidad de las características morfológicas es escasa, o están sujetos a la influencia del ambiente y por ello resultan no ser informativos, los datos moleculares han aportado información directa del genotipo permitiendo la caracterización de un organismo o grupos de organismos.

Una ventaja de los caracteres moleculares, que utilizan secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos, es que pueden construir filogenias de organismos, independientemente de la morfología que presenten.

Existen varios factores a tener en cuenta en el momento de elegir un marcador molecular y la región adecuada de la secuencia total de un gen para el análisis (Irwin & Wilson, 1991). La región del marcador a ser comparada debe evolucionar a una tasa apropiada para los tiempos de divergencia de las OTUs de interés, idealmente esto significa que debe proveer diferencias suficientes para diferenciar los taxones en grupos monofiléticos (grupo proveniente de un único ancestro común más su ancestro). El gen utilizado como marcador debe presentarse idealmente como una copia única o al menos debe evolucionar como tal. El gen debe tener la misma función en todos los taxones.

Cuando se trabaja con filogenias moleculares, nunca debemos olvidar el hecho de que cuando construimos filogenias con secuencias génicas estamos construyendo

estrictamente la filogenia del gen analizado y no implica que se esté reconstruyendo necesariamente la filogenia de las especies que portan ese gen. La expectativa de la sistemática molecular es que la filogenia de los genes concuerde con la de los organismos.

### **3.3 Alineamiento**

Al igual que en otros tipos de caracteres, la asignación de homologías en los datos de secuencias de ADN es clave para el análisis filogenético. Se definen como estados homólogos a aquellos que se originan filogenéticamente unos de otros preexistentes.

Cuando se analizan secuencias de ADN, los caracteres son las posiciones a lo largo de dichas secuencias. Los estados en aquellas secuencias que no difieren en el largo son las bases Adenina, Timina, Citosina o Guanina. Antes del alineamiento de secuencias con distinto largo, no hay hipótesis de homología para cada posición nucleotídica. El punto crítico de este proceso es la inserción de segmentos (*gaps*), de forma tal de recuperar las homologías entre los nucleótidos, ya que si este paso falla, se producirá una asignación incorrecta de homologías.

Por todo lo expuesto, el alineamiento es un paso crítico, porque provee las hipótesis de homología provisionarias para cada estado de carácter. El rigor en los análisis subsiguientes no tendrá sentido si la homología inicial es incorrectamente inferida. Distintos programas han sido desarrollados para evitar el alineamiento manual de las secuencias, y en consecuencia disminuir el grado de subjetividad (Doyle & Davis, 1998).

### **3.4 Métodos de reconstrucción filogenética**

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los genes en estudio, es necesario extraer e interpretar esa información evolutiva contenida en las mismas. Para ello se han desarrollado métodos analíticos basados en estadísticos complejos que tienen en cuenta los mecanismos de evolución y las propiedades biológicas de las moléculas en estudio.

Estos métodos de inferencia filogenética dan como resultado un árbol que es una representación gráfica de las relaciones entre los taxones usados para modelar la historia evolutiva del grupo en estudio. Un árbol consiste en nodos que conectan ramas. Los nodos terminales (OTUs) representan secuencias u organismos para los que contamos con datos,

mientras que los nodos internos representan OTUs o ancestro hipotéticos. El ancestro de todos los OTUs es la raíz del árbol (Fig. 6).

Los cladogramas pueden tener o no raíz. La raíz otorga direccionalidad y da idea de relaciones de ancestralidad entre las OTUs. Para enraizar un árbol es necesario introducir en el análisis un grupo externo (*outgroup*) que debe estar relacionado filogenéticamente con los taxones del grupo de estudio, haber divergido tempranamente y tener una divergencia mayor con cualquiera de los miembros de estudio que ellos entre sí.

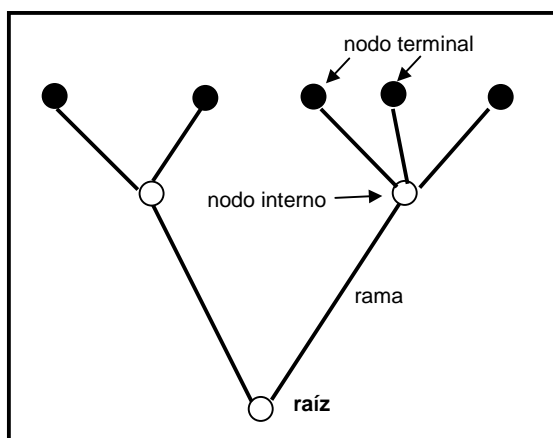
La inferencia filogenética constituye la base de la clasificación ya que permite agrupar los organismos por parentesco y reflejar su historia evolutiva. El cladismo toma en cuenta grupos monofiléticos o clados. Un grupo monofilético incluye a un ancestro y a todos sus descendientes, mientras que si se excluye a algún descendiente o al ancestro queda constituido un grupo parafilético.

Existen varios métodos de inferencia molecular, los más utilizados actualmente son neighbour-joining (NJ), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV). Los dos primeros han sido diseñados para caracteres moleculares y morfológicos y el último sólo para datos moleculares.

Cuando contamos con un número pequeño de secuencias encontrar un árbol óptimo mediante el estudio de todos los árboles posibles es una tarea sencilla. A este tipo de búsqueda se la llama exhaustiva. Sin embargo, en la mayor parte de los estudios generalmente se analizan por encima de 10 secuencias y es necesario emplear métodos de búsqueda heurísticos (Swofford, 1993). En este caso se analizan subconjuntos de los árboles posibles, esperando encontrar en ese subgrupo al árbol óptimo. El costo que tiene ese método es que no se puede asegurar la obtención del árbol con el menor número de cambios posibles (Hillis *et al.*, 1996).



**Figura 6.** Esquema de un árbol y sus partes asociadas.



### 3.5 Congruencia y calidad de datos. *Bootstrap*

La congruencia es la concordancia entre las filogenias estimadas a partir de distintos caracteres. Si para los diferentes conjuntos de datos obtenemos árboles similares, esto nos proporciona confiabilidad, ya que estarían reflejando la misma historia evolutiva (Page & Holmes, 1998).

En las filogenias moleculares el objetivo es encontrar el “único árbol verdadero” para un conjunto de secuencias. A medida que aumenta la cantidad de árboles obtenidos, menor es la precisión que obtenemos para explicar los datos. Por lo tanto es necesario contar con alguna indicación de límites de confianza para las filogenias estimadas. Uno de los métodos más utilizados para estudiar si las topologías de los árboles obtenidos respaldan los datos es denominado *bootstrap* (Felsenstein, 1985a). Este método puede aplicarse a filogenias ya que genera pseudoréplicas (remuestreos). A partir de los datos originales, se elimina al azar un carácter y se duplica al azar otro carácter y se construye un árbol, este proceso se repite de 100 a 1000 veces dando como resultado un conjunto de árboles de *bootstrap* que contiene la información de los errores de muestreo asociados con nuestra muestra. Para un número alto de secuencias el número de frecuencias de un árbol se generan en un árbol consenso. Cada nodo en el consenso llevará asociado un valor de *bootstrap*, que es el porcentaje de veces que ese nodo está representado en los árboles obtenidos a partir de las pseudoréplicas. Un nodo que no se vio afectado en las 1000 topologías derivadas de las pseudoréplicas aparecerá en todos los árboles y se le asignará un 100% de valor de *bootstrap*.

### **3.6 Empleo de filogenia molecular para el estudio de especies de *Aspergillus***

El estudio de las relaciones evolutivas entre especies del género *Aspergillus* se ha enfocado mayoritariamente en aquellas especies económicamente importantes, ya sea por producir micotoxinas o por su aplicación en la industria. Varga *et al.* (2003) utilizaron la secuenciación parcial de los genes de  $\beta$ -tubulina y de la subunidad 26S del ARN ribosomal para evaluar las relaciones filogenéticas entre especies productoras de micotoxinas de las secciones *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Fumigati* y *Clavati*, lo cual les permitió concluir que la habilidad de producir micotoxinas es una habilidad que fue perdida (o ganada) varias veces durante la evolución del género. Dentro de la sección *Flavi*, los trabajos de filogenia mas representativos son los de Geiser *et al.* (1998; 2001) ya que permitieron el establecimiento de dos grupos (grupo I y II) dentro de *A. flavus*, correlacionados con la producción de aflatoxinas y esclerocios; además permitieron establecer la relación entre *A. flavus* y *A. oryzae*.

Los estudios filogenéticos moleculares han sido aplicados como herramienta para el establecimiento de nuevas especies dentro del género. Para la sección *Flavi*, las especies *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, y *A. bombycis* han sido descritas basadas mayoritariamente en datos moleculares (Kurtzman *et al.*, 1987; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001).

Todos los estudios de filogenia molecular, al igual que la mayoría de los trabajos en *Aspergillus*, han sido realizados en el hemisferio Norte y dentro del hemisferio Sur, sólo en Australia. Para América del Sur y Argentina es poco lo que se conoce.

## **4. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE ASPERGILLUS SECCIÓN FLAVI EN LA ARGENTINA**

En la Argentina se han llevado a cabo varios estudios sobre *A. flavus* y *A. parasiticus* provenientes de semillas de maní cultivado, maíz o suelo, con el objeto de caracterizar morfológica, toxigénica y genéticamente a las poblaciones presentes en nuestro país (Vaamonde & Varvsavsky, 1979; Vaamonde *et al.*, 1995; Resnik *et al.*, 1996; Nesci & Etcheverry, 2002; Novas & Cabral, 2002; Barros *et al.*, 2003). Con respecto a otras especies de la sección *Flavi*, no hay registros de estudio en nuestro país.

La provincia de Córdoba fue uno de los primeros lugares en donde se aislaron cepas de *A. flavus* tipo S, productoras de aflatoxinas B y G (Vaamonde *et al.*, 1995). Los aislamientos de *A. flavus* analizados resultaron ser mayoritariamente toxigénicos, con una alta producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico (Vaamonde *et al.*, 1995; Vaamonde *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2003).

Otra herramienta de estudio que se ha utilizado en nuestro país, es la compatibilidad vegetativa. Novas y Cabral (2002) fueron los primeros que comenzaron a utilizar esta técnica para aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mientras que otro aporte para *A. flavus* aislado de suelo ha sido realizados por Barros *et al.* (2005).

El maní es uno de los cultivos más propensos a la contaminación por micotoxinas. Es por este motivo que la mayoría de los estudios sobre diferentes aspectos de la biología de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se han realizado a partir de aislamientos de semillas de maní.

## 5. EL MANI

### 5.1 Breve descripción botánica del género *Arachis*

El género *Arachis* L. pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoide, tribu Hedysereae, se encuentra dividido en 9 secciones y la especie tipo es *A. hypogaea* L. (maní cultivado). Hasta la actualidad se han descrito 69 especies y el 40% de las mismas se encuentra dentro de la sección *Arachis*. Las secciones se clasifican taxonómicamente de acuerdo a características morfológicas, distribución geográfica y variaciones de fertilidad de híbridos intra-seccionales (Krapovickas & Gregory, 1994).

El origen del género *Arachis* fue en la sierra de Amambay, en el límite entre Mato Grosso do Sul con Paraguay, donde crece *A. guaranítica* Chodat & Hassl., posiblemente la especie más antigua del género (Gregory *et al.*, 1980). El área de extensión de este género comprende unos 4000 kms tanto hacia el NE, hasta el Amazonas, como hacia el O, hasta los Andes, dentro de esta se encuentra el área de la sección *Arachis* que presenta un eje que más o menos coincide con los meridianos 57° y 58°, que abarca las cuencas de los ríos Paraguay y Uruguay y termina en el Río de la Plata (Figura 7).

El género *Arachis* se encuentra compuesto por plantas anuales, bienales o perennes, erectas, decumbentes o procumbentes, a veces rizomatosas o estoloníferas. Hojas cuadrifolioladas, a veces trifolioladas; indumento constituido por pelos, cilia o emergencias; espigas paicufloras axilares; flores sésiles, corola anaranjada o amarilla; estandarte con líneas rojas en la cara superior o en la cara inferior o en ambas caras; fruto subterráneo; ginóforo (“clavo”) vertical u horizontal; semilla lisa, tegumento rosado pálido u ocráceo en las especies silvestres o con colores varios en el maní cultivado (Fig. 8). El fruto maduro es una legumbre indehiscente con 1 a 5 semillas cilíndricas u ovoides que pueden pesar desde 0.2 a 2gr (Parodi, 1972). Es muy nutritiva y alta en calorías, contiene 25% de proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, fibras, vitamina E, calcio, fósforo, magnesio, zinc, riboflavinas, tiaminas, hierro, etc. (Kokalis-Burelle *et al.*, 1997).

La sección *Arachis* presenta como carácter exclusivo frutos con pericarpio muy reticulado, y el carácter que permite la separación más amplia entre especies dentro de la sección es si las plantas son perennes o anuales, aunque aún son necesarios nuevos estudios para valorizar los caracteres que podrían ser útiles para un ordenamiento dentro de la sección *Arachis* (Krapovickas & Gregory, 1994).

**Figura 7.** Origen y distribución de las especies nativas del género *Arachis*.

Los registros arqueológicos sustentan la existencia de consumo de maní entre los años 2500 y 300 AC en los oasis de los desiertos peruanos (Weiss, 2000; Smith, 2002). En La Argentina se encuentran algunas especies silvestres de la sección *Arachis*: *A. monticola* Krapov. & Rigori, *A. duranensis* Krapov. & W. C. Gregoy, *A. villosa* Benth., *A. correntina* (Burkart) Krapov. & W. C. Gregoy, y *A. burkartii* Handro y *A. glabrata* Benth. de la sección *Rhizomatosae*.

**Figura 8.** Planta de *A. hypogaea*, maní cultivado.



## 5.2 Importancia de las especies silvestres del género *Arachis*

Varias especies perennes poseen una gran importancia como forrajeras y como fijadoras de dunas, por los que son muy buscadas por la creciente demanda de programas de agricultura sustentable. *A. glabrata* es utilizada como leguminosa forrajera en regiones subtropicales de Estados Unidos, donde esta planta cuenta con una excelente adaptación, aunque debido a que su implantación es por rizomas (debido a la baja producción de semillas) la escala comercial es restringida (Williams & Chambliss, 1999). Mientras que otras son muy útiles en el mejoramiento del maní cultivado, como es el caso de un nuevo

cultivar donde se incorporó germoplasma proveniente de 3 especies salvajes relacionadas (*A. cardenasii* Krapov. & WC Gregory, *A. diogoi* Hoehne y *A. batizocoi* Krapov. & WC Gregory) para reducir la infección de nematodos en cultivares no resistentes (Simpson & Starr, 2001). *A. stenosperma* Krapov. & WC Gregory y *A. villosulicarpa* Hoehne constituyen ejemplos de domesticación de las especies silvestres, ya que las tribus indígenas del Mato Grosso Brasileño utilizan sus frutos como alimento (Freitas *et al.*, 2003).

El clavo de las especies silvestres tiene una capa de abscisión bien definida que se desintegra después de la madurez de la vaina, resultando en una pronta separación de las vainas maduras lo cual hace muy difícil su cosecha. Esta característica y la baja producción de semillas dado que la dispersión es principalmente rizomatosa, hacen que las especies silvestres no sean muy utilizadas para la producción de frutos. En *A. hypogaea*, esta capa de abscisión se ha perdido y las vainas maduras permanecen adheridas a la planta, lo cual refleja un largo período de domesticación.

Con excepción de *A. monticola*, que es poliploide, al igual que *A. hypogaea*, todas las especies silvestres son diploides. Esto produce esterilidad de los híbridos que se obtienen por cruzamientos entre especies compatibles de manera que los investigadores deben manipular los niveles de ploidia, determinar las asociaciones cromosómicas y recombinación genética para la incorporación de genes de especies silvestres al maní cultivado.

### **5.3 *A. hypogaea***

#### **5.3.1 Taxonomía**

La primera mención publicada que conocemos del maní o *Mandubi* se debe a Gonzalo Hernández de Oviedo y Valdés (1478-1557), en su “Historia General y Natural de las Indias, Islas y Tierra Firme del Mar Océano”, aparecida por primera vez en Sevilla, en 1535.

*A. hypogaea* es un anfidiplóide cuyos ancestros aún no han sido determinados en forma concluyente. De las varias especies propuestas como posibles antecesores se destacan, *A. duranensis* y *A. ipäensis* Krapov. & W.Gregory como los probables progenitores diploides del maní cultivado. Aunque no debe descartarse la participación de

mas de dos especies, tomando en cuenta la diferencia entre las dos subespecies de *A. hypogaea* (Krapovickas & Gregory, 1994).

Para establecer las relaciones entre *A. hypogaea* y las especies silvestres del género *Arachis* se hicieron numerosos intentos de cruzamientos interespecificos. En 1957 Krapovickas y Rigori lograron obtener progenie fértil del cruzamiento de *A. hypogaea* y *A. monticola* ( $2n= 40$ ) demostrando que esta especie silvestre sería la mas afín al maní cultivado.

Las subespecies en que se divide *A. hypogaea* son: subsp. *hypogaea* y subsp. *fastigiata* Waldron. Las diferencias más notables entre las subespecies son el color del follaje y la disposición de las flores (Krapovickas & Gregory, 1994). A su vez las subespecies en las que se divide taxonómicamente al maní cultivado, están separadas en variedades que agrupan cultivares o varietales.

*A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea* comprende el cultivar *Virginia* y *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *peruviana* Krapov. & Gragory el cultivar *Peruviano*. Estos cultivares se caracterizan por ser rastreros, vulgarmente conocidos como *runner* (corredoras en inglés), sus ramas laterales permanecen cerca del suelo, dando una apariencia de esparcirse por el mismo y requieren de 5 a 10 meses para desarrollar. *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* tiene a *Valencia* como varietal muy difundido y *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *vulgaris* C. Harz al varietal *Spanish*, ambos caracterizados como erectos, *bunchy* (manejo en inglés), debido a que el crecimiento vertical de las ramas le da a la planta madura una forma compacta, como la de un arbusto. Las variedades erectas usualmente producen un menor rendimiento de granos que las rastreras. Sin embargo, tienden a dar semillas de mayor contenido en aceite y proteínas (Weiss, 2000; Bunting *et al.*, 1985).

### 5.3.2 Producción, utilización y ecología

El maní es la cuarta semilla oleaginosa (su producción es prácticamente igual a la de girasol) en orden de importancia en cuanto a la producción mundial, luego de la soja, el algodón y la colza, al igual que lo observado para nuestro país (SAGPyA, 2004). En la actualidad, el maní se encuentra ampliamente difundido a nivel mundial. Entre los países



productores más importantes se encuentran India, China, Estados Unidos, Sudáfrica, África del Este, y Brasil.

El cultivo de maní en nuestro país está orientado a la obtención de maní tipo *runner* apto para confitería, segmento del mercado mundial en el que nuestro país ha alcanzado un liderazgo en materia de exportaciones. Con el fin de crear cultivares de maní con estas características y adaptados a nuestro medio, el INTA Manfredi en el año 1975 desarrolló el cultivar *Florman* INTA a partir del cultivar multilínea *Florunner* proveniente de la Universidad de Florida.

En 1994, el INTA implementó el proyecto “Maní 2000”, con el fin de mejorar la comercialización y tipificación del maní e introducir nuevas prácticas de cultivo y manejo de cosecha y post-cosecha. Se observó un sostenido incremento de la producción durante los últimos 5 años (Fig.9), siendo actualmente el tercer exportador mundial de maní tipo confitería y el octavo productor de aceite. (Pedelini & Casini, 1998). En 1998 la producción Argentina de maní con cáscara ocupó el 4to. lugar, luego de África, China y Estados Unidos (Pedelini & Casini, 1998).

En la Argentina el 92% de la producción, acopio, comercialización e industrialización se concentra en el centro de la provincia de Córdoba mientras que el porcentaje restante se divide entre las provincias de Salta, Formosa, Corrientes, San Luis y a partir del 2004 Santa Fe (Fig. 9 y 10) (SAGPyA, 2004). La producción de maní en la provincia de Corrientes se efectúa como un cultivo de “huerta”, no extensivo como en el resto de las provincias, los productores están subsidiados por el gobierno provincial quien se encarga de brindarles las semillas para su cultivo. La variedad que se utiliza es *Valencia*, vulgarmente conocido como “maní negro de Corrientes y Misiones”, y el consumo es mayoritariamente local (INDEC, 2001). En la actualidad, en nuestra región manisera se producen cultivares pertenecientes a dos tipos comerciales: *Runner* (*Florman* INTA, Tregua, Nahuel y *Florunner*) que ocupa el 90% del área, y *Valencia* (Colorado Irradiado INTA) (Bragachini, 1994).

La aptitud de comercialización del maní está principalmente afectada por las condiciones climáticas al momento de la cosecha. Los lotes que cumplen las exigencias de limpieza, tamaño y sanidad adecuadas se destinan a confitería y elaboración de pasta de maní. El resto de la producción tiene como destino final la molturación para la obtención de

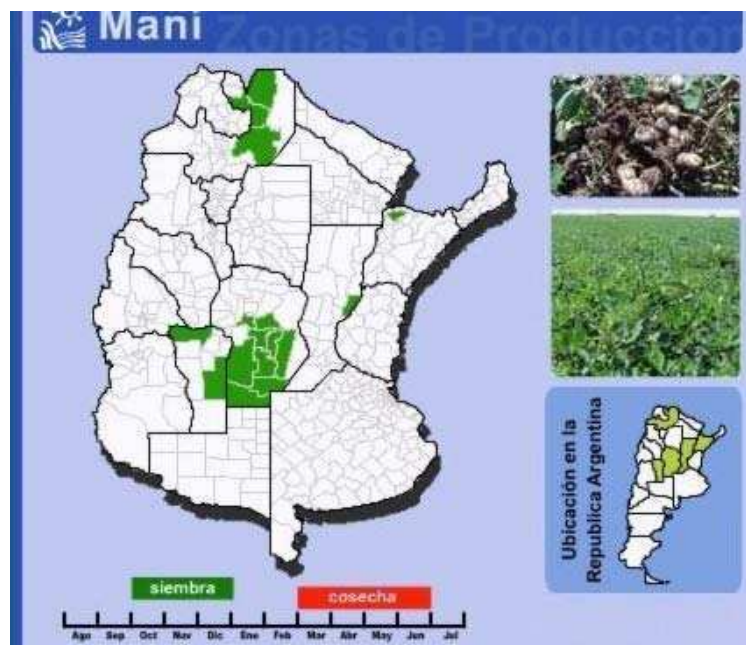
aceite, producto que tiene una interesante demanda en mercados internacionales y que en contraposición es casi desconocido por el consumidor local.

El maní, el aceite de maní y los complejos proteicos a base de maní constituyen un importante segmento del comercio mundial en productos y semillas oleaginosas. El aceite de maní es una excelente fuente de ácidos grasos mono y polisaturados; contiene alrededor de 1% de ácido palmítico y 80% de oleico y linoleico. Argentina es el segundo exportador de aceite de maní a nivel mundial, a continuación de Senegal, participando en el período 2000/03 con un porcentaje que fluctuó entre el 16,0% y el 27,3%. La totalidad del aceite de maní se extrae a través de un doble sistema de prensa y posterior extracción por solventes, su destino principal es la elaboración de aceites mezclas, seguido por el uso como saborizante en la industria de panificación y confitería. La producción de aceite tiene un volumen de elaboración errático debido a que se trata de un eslabón de transformación de excedentes y remesas de la producción con destino a confitería.

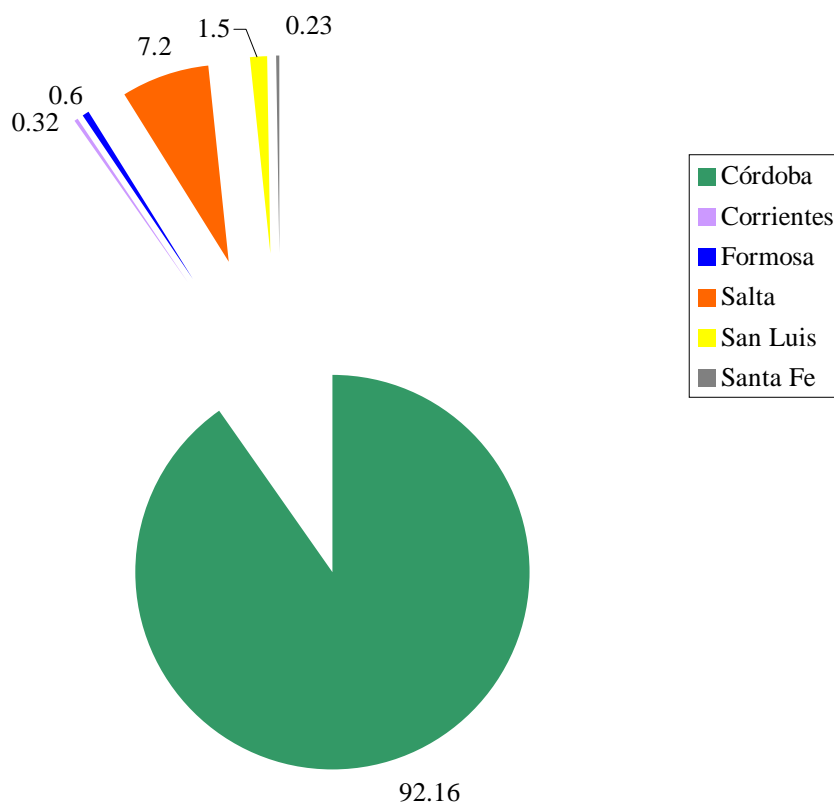
Como subproducto de la extracción de aceite se obtiene una harina oleaginosa de alto contenido en proteínas vegetales y de excelente calidad, la que es comercializada en forma de pellets, contando con una importante demanda con destino a la alimentación animal (SAGPYA, 2004).

El cultivar Florman INTA es apto para consumo directo y también de excelente calidad para manteca. La materia prima utilizada debe ser maní confitería, de calibre medio a medio grande, carente de defectos y con ausencia total de aflatoxinas. El crecimiento de la industria nacional de este producto se encuentra limitado por la existencia de cuotas en el mercado norteamericano y por un consumo interno prácticamente inexistente.

**Figura 9.** Provincias productoras de maní en la Argentina, campaña 2003/2004 (Dirección de Coordinación de Delegaciones, SAGPYA).



**Figura 10.** Participación relativa de las provincias en la producción de la campaña 2003/2004 (Dirección de Coordinación de Delegaciones, SAGPYA).



Las provincias de San Luis y Santa Fe no fueron incluidas en esta tesis.

El rango geográfico principal de cultivo del maní se encuentra entre los 35°S y los 40°N, pero se extiende hasta los 45°N en Asia Central y en Norteamérica. Se adapta a una amplia variedad de condiciones ambientales. Usualmente, su crecimiento con fines comerciales se realiza por debajo de los 1250 m. de altura, aunque muchas variedades pueden ser encontradas a mayores alturas (Weiss, 2000).

Su crecimiento se ve adversamente afectado por baja intensidad lumínica. Los tipos *bunchy* se ven generalmente más afectados por la variación climática que los tipos *runner*. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de la planta se encuentran entre los 25 y 30°C (Weiss, 2000). Una vez arraigada, la planta del maní es resistente a la sequía, y hasta cierto límite también puede soportar inundaciones. Registros pluviométricos desde 500 hasta 1000 mm permiten una producción de nivel comercial, aunque este cultivo puede ser producido con cantidades tan escasas como hasta 300 mm de lluvia anual. Una vez que las vainas han madurado, la lluvia lo afecta de forma adversa, ya que algunos cultivares tienen un período de latencia muy corto y germinan sólo bajo condiciones favorables.

El maní tiene requerimientos específicos sobre el tipo de suelo en el que debe ser cultivado, por su particularidad de presentar flores aéreas y frutos enterrados en el suelo, siendo necesario suelos livianos de textura franco arenosa o arenoso franco, profundos, con buen drenaje, libre de sales y de reacción ligeramente ácida (pH 6-6.5). En un suelo con estas características el maní desarrolla un sistema radicular amplio y profundo, confiriendo a la planta menor susceptibilidad a la sequía. Buen drenaje significa también buena aireación, lo cual es esencial para las leguminosas como el maní para fijar nitrógeno del aire (Pedelini & Casini, 1998).

Las plantas de maní bajo condiciones de stress hídrico y elevadas temperaturas son muy susceptibles a ser invadidas por hongos productores de toxinas (Hill *et al.*, 1983). El cultivar *Florunner*, maní más cultivado a nivel mundial, es especialmente susceptible a la colonización por parte de *Aspergillus* spp. y a la acumulación de aflatoxinas (Xu *et al.*, 2000), siendo *A. flavus* la especie dominante en maní, como también en maíz y algodón (Horn *et al.*, 2000). El rol de la agricultura en la estructura de las comunidades de hongos productores de aflatoxinas es muy poco clara y varias estrategias de manejo son necesarias para reducir el nivel de contaminación de los cultivos por parte de *Aspergillus* spp. y por

ende reducir además el nivel de aflatoxinas dentro de los límites establecidos como aptos para la elaboración de alimentos, resultando en pérdidas económicas importantes.



- Llevar a cabo un relevamiento de *A. flavus* en semillas y hojas de maní cultivado provenientes de las diferentes zonas agroecológicas de producción en la Argentina.
- Realizar un relevamiento de especies de *Aspergillus* sección *Flavi* en poblaciones naturales de especies nativas de maní.
- Caracterizar morfológica y toxigénicamente los aislamientos obtenidos de las distintas regiones.
- Analizar la producción de las estructuras de resistencia (esclerocios) y relacionarlas con el perfil de producción de aflatoxinas de los aislamientos analizados.
- Por medio de la técnica de compatibilidad vegetativa como un marcador multilocular, estudiar la estructura poblacional y diversidad genética de maní.
- Comparar la diversidad genética, a través del establecimiento de grupos de compatibilidad vegetativa, entre los aislamientos provenientes de semillas y hojas de maní cultivado, especies nativas silvestres y regiones agroecológicas.
- Llevar a cabo una revisión de la sección *Flavi* por medio de técnicas moleculares, morfológicas y químicas.





- La incidencia y características de los miembros de la sección *Flavi* de maníes cultivados y nativos de la Argentina son diferentes.
- Los factores bióticos y abióticos propios de cada zona agroecológica afectan la distribución e incidencia de *A. flavus* en maní cultivado.
- La capacidad de producción de esclerocios y aflatoxinas por parte de *A. flavus* está afectada por el sustrato y las condiciones ambientales.
- Los aislamientos mas frecuentes de *A. flavus* en plantas nativas y cultivadas de maní son productores de esclerocios tipo L y aflatoxinas tipo B.
- Existe una correlación entre la presencia y tipo de esclerocios y la presencia y tipo de aflatoxinas.
- La técnica de compatibilidad vegetativa es efectiva para establecer la estructura de las poblaciones de *A. flavus* en las regiones maniseras de la Argentina. Existe correlación entre los grupos de compatibilidad vegetativa y la producción de esclerocios y aflatoxinas.
- Las características morfológicas, producción de extrolitos y la secuenciación del gen de  $\beta$ -tubulina permiten constituyen herramientas para clarificar la taxonomía de la sección *Flavi*.



## Introducción de la sección

El maní (*A. hypogaea*) es un cultivo económicamente importante en la Argentina, su producción anual alcanza los 350 millones de toneladas. Este cultivo es frecuentemente invadido por especies del género *Aspergillus* durante la pre-cosecha. *A. flavus* aparece como la especie dominante en varios cultivos, pero en maní *A. parasiticus* ha sido la especie aflatoxigénica más frecuentemente asociada, siendo las comunidades fúngicas muy variables y frecuentemente diferentes entre regiones (Hill *et al.*, 1985, Diener *et al.*, 1987).

El conocimiento de las diferencias regionales de las comunidades de *A. flavus*, como también su rango de hospedantes y su asociación con los cultivos dominantes de una región, son factores importantes para la determinación de las medidas de control más efectivas para reducir la contaminación pre-cosecha con aflatoxinas.

Por otro lado las especies nativas de *Arachis* pueden actuar como reservorios de *Aspergillus flavus* y otras especies. En la actualidad son utilizadas para el mejoramiento del maní cultivado (Simpson y Starr, 2001), por lo que es muy útil conocer las especies de *Aspergillus* asociadas. Las plantas nativas producen muy pocas semillas, y las que llegan a la madurez se pierden rápidamente debido a que en estas especies el ginóforo es una estructura muy frágil (Krapovickas y Gregory, 1994). De esta manera la reproducción ocurre por vía vegetativa; éste es uno de los motivos por los que resulta importante caracterizar las especies aflatoxigénicas de *Aspergillus* presentes en las hojas y compararlas con aquellas que infectan hojas y semillas de la especie cultivada *A. hypogaea*. Contribuyendo de esta manera al conocimiento de las poblaciones que pueden encontrarse en diferentes especies y dentro de una misma planta en distintos órganos, para verificar si *Aspergillus* sección *Flavi* tiene rangos de hospedantes específicos, si existen nuevas relaciones y si al variar el sustrato pueden encontrarse especies no identificadas hasta el momento.

## objetivos particulares

- Analizar la presencia de *A. flavus* en semillas de maní provenientes de las zonas cultivadas de las provincias de Córdoba, Formosa, Salta y Corrientes, Argentina.

- Evaluar la importancia de algunas especies nativas del género *Arachis* como reservorios de *Aspergillus* sección *Flavi*.
- Comparar la incidencia de *A. flavus* y especies relacionadas, en hojas de *Arachis* nativas y maní cultivado dentro de la provincia de Corrientes.

## **HIPÓTESIS**

- Los miembros de la sección *Flavi* se encuentran frecuentemente en maníes cultivados y nativos de la Argentina.
- *A. flavus* y *A. parasiticus* son las especies predominantes en maní cultivado y nativo.
- En las especies nativas de *Arachis* la frecuencia de *A. flavus* es menor, debido a una resistencia natural de la especie.
- La distribución e incidencia de *A. flavus* en maní cultivado se encuentra correlacionada con factores propios de cada zona agroecológica, tales como el clima, y prácticas agro culturales.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Aislamiento de cepas de *A. flavus* a partir de semillas de maní cultivado**

Para los aislamientos de semilla de maní cultivado, se tomó en cuenta a la especie *A. flavus* para la caracterización morfológica, toxigénica y de compatibilidad vegetativa (VC). No obstante en los aislamientos también se registró el número de cepas de *A. parasiticus* que aparecieron en las semillas analizadas.

#### **1.1 Muestreo de semillas de maní cultivado (*A. hypogaea*)**

Se estudiaron muestras de maní de las provincias de Formosa y Salta correspondientes a la cosecha 2001 y de la provincia de Corrientes de la cosecha 2005. Los aislamientos se realizaron durante los 2 meses posteriores a su recolección. La muestra proveniente de la provincia de Formosa fue tomada de un campo experimental (600 ha) en la localidad de Las Lomitas y representa la primer cita del cultivo de maní en esta provincia, mientras que las muestras de la provincia de Salta proceden de cuatro campos localizados en la zona de Tartagal donde se encuentra localizado el cultivo de maní en esa

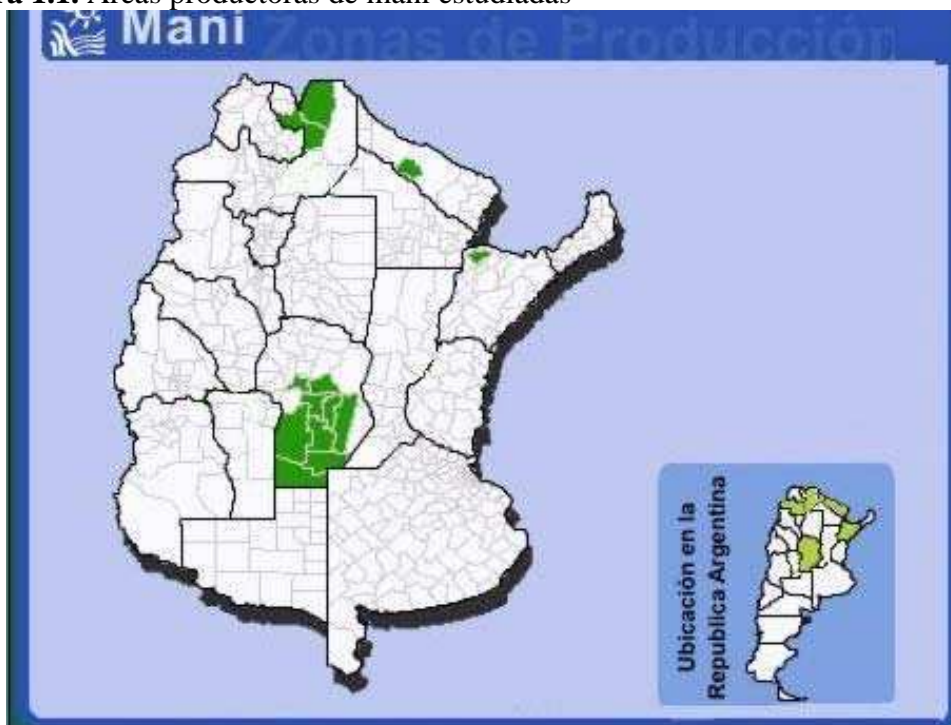
provincia (9000ha) (Fig. 1.1). El muestreo en las provincias de Formosa y Salta fue realizado por personal de las Estación Experimental Agropecuaria El Colorado (INTA) y de la Agencia de Extensión Rural de Gral. Mosconi (INTA) respectivamente, a nivel de productores procurando tomar semillas con la vaina sin daños.

Para la provincia de Corrientes se tomaron 4 muestras de lotes localizados en la zona de Empedrado, en una campaña realizada en Enero de 2005 (Fig. 1.1). En esta provincia el cultivo de maní es familiar y se presenta como pequeños huertos sobre lotes de 1-3ha, mientras que en el resto de las provincias el cultivo es extensivo.

Los aislamientos de la provincia de Córdoba, que se utilizaron para comparar nuestros resultados, fueron los obtenidos por Vaamonde *et al.*, (1995) y Novas y Cabral (2002) (Fig. 1.1).

En nuestro país el cultivar de maní que se produce en las provincias de Córdoba, Formosa y Salta corresponde al cultivar *Runner* (*Florman* INTA, *Tegua*, *Nahuel* y *Florunner*) mientras que en la provincia de Corrientes es el *Valencia*, conocido también como “maní negro de Corrientes y Misiones”.

**Figura 1.1.** Áreas productoras de maní estudiadas



### **1.2 Aislamiento de *A. flavus*.**

Se seleccionaron y procesaron las legumbres que no presentaban daños. Cada una se esterilizó superficialmente en NaOCl 2% con 100 µl/l de Tween 20 (1 min) seguido de un lavado breve con agua destilada estéril y posterior apertura a mano para extraer las semillas. Seiscientas semillas procedentes de diferentes vainas se esterilizaron de la misma manera que las vainas, y fueron colocadas en placas de Petri (5 semillas / placa de 9 cm de diámetro) conteniendo agar Dicloran18% glicerol (DG18, anexo pág. I) e incubadas durante 7 días a 30°C. Se aislaron los *Aspergillus* de color verde amarillento, típico del grupo *A. flavus*, y se descartaron los escasos aislamientos que presentaron con el tiempo cambio de color a tonalidades castañas.

## **2. Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* a partir de hojas de maní cultivado y nativo**

Debido a que no hay estudios previos sobre la incidencia de las especies de la sección *Flavi* sobre hojas de maní cultivado y nativo se registraron, además de *A. flavus*, otras especies de la sección *Flavi*.

### **2.1 Muestreo de hojas de maní cultivado y nativo**

Las hojas de maní cultivado para realizar el estudio se colectaron de los mismos cuatro lotes analizados para la producción de semillas de la zona de Empedrado, Corrientes y de tres sitios mas representados en la Fig. 1.2 y en la Tabla 1.1 Las hojas se recolectaron durante una campaña a la provincia de Corrientes en Enero de 2005.

Las hojas de maní nativo se muestrearon durante una campaña a las provincias de Entre Ríos y Corrientes en Enero de 2004. Se tomaron muestras de poblaciones de distintas especies de *Arachis* nativas de acuerdo a los registros de Krapovickas y Gregory (1994) (Fig. 1.2; Tabla 1.1). La identificación de las distintas especies de *Arachis* relevadas se efectuó de acuerdo a la caracterización realizada por Krapovickas y Gregory (1994), la identificación fue corroborada por el Ing. A. A. Krapovickas.

Las muestras se colocaron en bolsas plásticas a 5°C y analizadas en los 3 días siguientes de haber sido tomadas.

## **2.2 Aislamiento de *A. flavus* y otras especies de la sección *Flavi*.**

Se analizaron 60 hojas por muestra, de cada una se cortó un trozo de 1cm de lado, los cuales se esterilizaron superficialmente en NaOCl 2% con 100 µl/l de Tween 20 (1 min) seguido de un lavado breve con agua destilada estéril y fueron colocados en placas de Petri (5 trozos de 5 hojas distintas / placa de 9 cm de diámetro) conteniendo agar Dicloran18% glicerol (DG18) e incubadas durante 7 días a 30°C.

Se aislaron los *Aspergillus* de color verde amarillento, típico del grupo *A. flavus*, como también los aislamientos que presentaron con el tiempo cambio de color a tonalidades castañas u otras características distintivas.

**Figura 1.2.** Ubicación de sitios de muestreo y especies de *Arachis* analizadas.



**Tabla 1.1.** Localidades de las provincias de Corrientes y Entre Ríos de donde se obtuvieron muestras de hojas de especies de maní cultivado y nativo.

<i>Sitio</i>	<i>Ubicación<sup>a</sup></i>	<i>Localidad</i>	<i>Provincia</i>	<i>Especie de Arachis<sup>b</sup></i>
1	33°03'50'' 58°22'51''	Balneario “Ñandubaizal, Gualeduaychu	Entre Ríos	<i>A. villosa</i>
2	31°52'20'' 58°12'27''	Pque. Nac. “el Palmar”, Colón	Entre Ríos	<i>A. villosa</i>
3	31°21'57'' 57°59'50''	“Pque. Rivadavia”, Concordia	Entre Ríos	<i>A. burkartii</i>
4	30°37'20'' 57°58'46''	Estancia “La Brava”, Santa Eloisa	Entre Ríos	<i>A. burkartii</i>
5	30°37'20'' 57°58'46''	“Bañados del Mocoretá”	Entre Ríos	<i>A. burkartii</i>
6	30°37'20'' 57°58'46''	“Laguna Mansa” Paso de los Libres	Corrientes	<i>A. villosa</i>
7	28°10'46'' 56°35'18''	Ruta prov. N°94, a la altura de Rincón Mercedes	Corrientes	<i>A. glabrata</i>
8	27°33'50'' 56°35'18''	Ruta acceso a Ituzaingó	Corrientes	<i>A. glabrata</i>
9	27°20'53'' 58°14'09''	Ruta acceso Itatí	Corrientes	<i>A. correntina</i>
10	27°25'33'' 58°43'28''	Ruta Nac. N°12, acceso Aeropuerto “Punta Comba”, Corrientes	Corrientes	<i>A. correntina</i>
11	27°33'27'' 58°43'26''	Puente Pesoa, ruta Prov. N°46	Corrientes	<i>A. correntina</i>
12	27°51'42'' 58°45'46''	Rio Empedrado, sobre Ruta Nac. N°12	Corrientes	<i>A. glabrata</i>
13	29°21'24'' 58°10'55''	Ruta Prov. N°119, acceso Justino Solari	Corrientes	<i>A. burkartii</i>
14	33°27'09'' 58°48'01''	Bella Vista	Corrientes	<i>A. hypogaea</i>
15	28°06'36'' 58°47'21''	Colonia Bougne, Empedrado	Corrientes	<i>A. hypogaea</i>
16	27°54'25'' 57°27'03''	Colonia San Antonio, San Miguel	Corrientes	<i>A. hypogaea</i>
17	27°30'00'' 58°32'31''	San Luis del Palmar	Corrientes	<i>A. hypogaea</i>

<sup>a</sup>Latitud y Longitud tomadas por GPS (*Global Positioning System*)

<sup>b</sup>Las especies de *Arachis* fueron identificadas de acuerdo a Krapovickas y Gregory (1994)

### **3. Identificación de *A. flavus* y otras especies de la sección.**

Las cepas aisladas se transfirieron a placas de Agar Papa Dextrosa (PDA, anexo pág. I) y se incubaron a 25°C durante 7 días para su identificación.

Se utilizó la clave de Pitt & Hocking (1985; 1997) y las sugerencias de Klich & Pitt (1988a y b). Cada cepa fue sembrada en Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA, anexo pág. I) y Agar Glicerol 25% Nitrato (G25N, anexo pág. I) e incubada a 25°C en todos los medios y a 37°C y 5°C en CYA. La observación se realizó a los 7 días de incubación. Se midieron los diámetros de las colonias en los tres medios de cultivo incubados a las diferentes temperaturas, se registró el color del anverso y el reverso, su textura, presencia de pigmentos y de esclerocios. Las características microscópicas analizadas fueron: presencia de cabezuelas con métulas y fiálides, o con fiálides solamente; tamaño y rugosidad de los conidios y largo y rugosidad de los estípites.

Los aislamientos también fueron cultivados en un medio diferencial para para *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, en el cual estas especies producen una coloración naranja diagnóstica en el reverso de la colonia luego de 48hs a 30°C. El medio se denomina Aspergillus Flavus y Parasiticus Agar (AFPA , anexo pág. I) Pitt y Hocking (1997). Las cepas fueron transferidas a tubos pico de flauta con agar Czapek-Dox (Cz-Dox , anexo pág. I) para su conservación a 5°C.

Las cepas conservadas en tubos pico de flauta fueron a su vez cultivadas en cajas de Petri con Cz-Dox como medio de cultivo. Al cabo de 7 días de crecimiento se tomaron cinco *plugs* con sacabocado estéril de cada una de las colonias y fueron colocados en eppendorfs de 2ml conteniendo 1 ml de agua destilada estéril. Los eppendorfs rotulados con el número de cepa y fecha de cultivo se almacenaron en heladera a 4°C para su conservación. Este método descrito por Smith y Onions (1994) asegura la estabilidad genética y características fenotípicas de los microorganismos, además de ser un método sencillo, económico y seguro para garantizar la supervivencia de cultivos fúngicos por períodos prolongados.

### **4. Caracterización climática de las zonas muestreadas**

Para la información sobre las características climáticas de los sitios correspondientes a las distintas poblaciones muestreadas, las variables elegidas fueron:

altitud, promedio estacional de temperaturas y precipitaciones (DeFina, 1992). Para la Provincia de Corrientes se registró la latitud y longitud para cada sitio muestreado, utilizando un GPS (Global Positioning System). Para las otras provincias analizadas estos datos fueron obtenidos de bibliografía (De Fina, 1992) ya que la toma de muestras la realizó el personal del INTA (Tabla 1.2).

## 5. Análisis estadístico

La frecuencia de aislamientos de las distintas especies de la sección *Flavi* aisladas de las hojas de plantas de maní nativo y cultivado fue estadísticamente analizado usando un diseño de ANOVA de un factor, seguido de la prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias ( $P= 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistix for Windows, version 2.1 Analytical Software.

**Tabla 1.2.** Caracterización climática y geográfica de las zonas maniseras de la Argentina.

	<i>Córdoba</i> <sup>a</sup>	<i>Formosa</i> <sup>a</sup>	<i>Salta</i> <sup>a</sup>	<i>Corrientes</i> <sup>a</sup>
<i>Ubicación (Lat. Sur)</i>	31 – 33.5	24 - 25	22 - 23	27 – 28
<i>Altura s/ nivel mar (metros)</i>	200 - 400	130	502	39 - 72
<i>Clima</i>	templado	subtropical	subtropical	subtropical tropical sin estación seca
<i>Precipitaciones (mm)</i>	800 - 900	700 - 800	800 - 900	1063
<i>T media °C (Dic/Ene/Feb)</i>	25 - 32°	28-45°	28-45°	34 - 41°
<i>Área agroclimática</i> <sup>b</sup>	39, 66	11	13	10

<sup>a</sup> La zona manisera de la provincia de Córdoba está definida en Vaamonde et al. (1995), mientras que para la provincia de Formosa los datos corresponden a la localidad de Las Lomitas, y para la provincia de Salta a la localidad de Tartagal. La zona manisera en la de Corrientes esta mayormente circunscripta a la región noroeste de la provincia.

<sup>b</sup> Las áreas son las definidas por DaFina (1992).

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento, caracterización e identificación de cepas de *A. flavus* de semillas de maní de las provincias de Formosa, Salta y Corrientes.

Se aislaron un total de 171 cepas de *A. flavus* de semillas de maní sin daño aparente. En la Tabla 1.3 se resume el porcentaje de incidencia para cada una de las tres zonas

analizadas. El mayor número de cepas se aislaron de la provincia de Salta ( $n= 118$ ) mientras que para las provincias de Formosa y Corrientes el número de aislamientos fue notoriamente menor ( $n= 40$  y  $n=13$ , respectivamente).

La mayoría de las cepas de *A. flavus* aisladas presentaron la morfología típica de la especie (Raper y Fennell, 1965; Pitt y Hocking, 1997). En AFPA la coloración del reverso de la colonia resultó color naranja característico de la especie. Estas cepas presentaron producción de esclerocios tipo L o resultaron no ser productoras bajo las condiciones de este estudio.

De las 171 cepas de *A. flavus* aisladas, 39 fueron identificadas como *A. flavus* “atípicos” (Saito *et al.*, 1986), todos ellos productores de esclerocios tipo S. Las características macroscópicas de estos aislamientos son muy diferentes a las de los *A. flavus* típicos, presentando colonias con micelio flocoso, poca producción de conidios y abundante producción de esclerocios pequeños; el reverso de las colonias en AFPA es naranja, al igual que en los *A. flavus* típicos y *A. parasiticus* (Fig. 3). Las características microscópicas se solapan con las de *A. flavus* típicos salvo por el tamaño y ornamentación de los conidios; los aislamientos atípicos tienen conidios menos rugosos y más pequeños (3-4.17 $\mu$ m de diámetro) (Fig. 3).

**Tabla 1.3.** Incidencia de *A. flavus* en semillas de maní de tres zonas agroecológicas distintas.

ZONA AGROECOLOGICA	% de semillas infectadas
<b>FORMOSA</b>	6.7 ( $n= 40$ )
Salta	19.7 ( $n=118$ )
Corrientes	2.17 ( $n= 13$ )

De las semillas de las provincias de Formosa y Salta se aislaron 4 y 7 cepas de *A. parasiticus* respectivamente, mientras que para la provincia de Corrientes se aislaron 25 cepas. Sólo se aislaron 12 cepas de *A. tamaritii*, todas para la zona de Salta.

## **2. Aislamiento e identificación de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* a partir de hojas de maní cultivado y nativo.**

Se aislaron un total de 144 cepas de un total de 17 sitios muestreados entre las provincias de E. Ríos y Corrientes, 100 a partir de hojas de plantas nativas y 44 de plantas cultivadas (Tabla 1.4). Las especies nativas de *Arachis* fueron: *A. villosa*, *A. burkartii*, *A. glabrata* y *A. correntina*. Los aislamientos identificados pertenecen a 4 especies de la sección *Flavi*: *A. flavus* (53.47%), *A. parasiticus* (38.9%), *A. tamaris* (2.08) y *A. caelatus* (0.69). El resto de los aislamientos ( $n= 7$ ; 4.86%) no pudieron incluirse dentro de ninguna de las especies descritas por lo cual se denominaron provisoriamente “*A. parasiticus* II” (Tabla 1.4, Fig. 1.4). *A. parasiticus* (56%) fue la especie dominante entre los aislamientos realizados de hojas de maní nativo, mientras que *A. flavus* (33%) fue la segunda especie más frecuente. La relación es diferente en los aislamientos a partir de hojas de maní cultivado (*A. hypogaea*), donde el 100% de los aislamientos fue identificado como perteneciente a *A. flavus* ( $n= 44$ ). La frecuencia de aparición de esta especie en los distintos sitios analizados se muestra en la Tabla 1.4. Las cepas de *A. flavus* aisladas corresponden a aislamientos tipo L o no productoras de esclerocios, no se encontraron cepas tipo S.

**Figura 1.3.** Características morfológicas particulares de *A. flavus* "atípicos".

*Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus* "atípicos"

A, C, E) Colonia en CYA, AFPA y conidios de *A. flavus* típicos. B, D, F) Colonia en CYA, AFPA y conidios de *A. flavus* "atípicos".

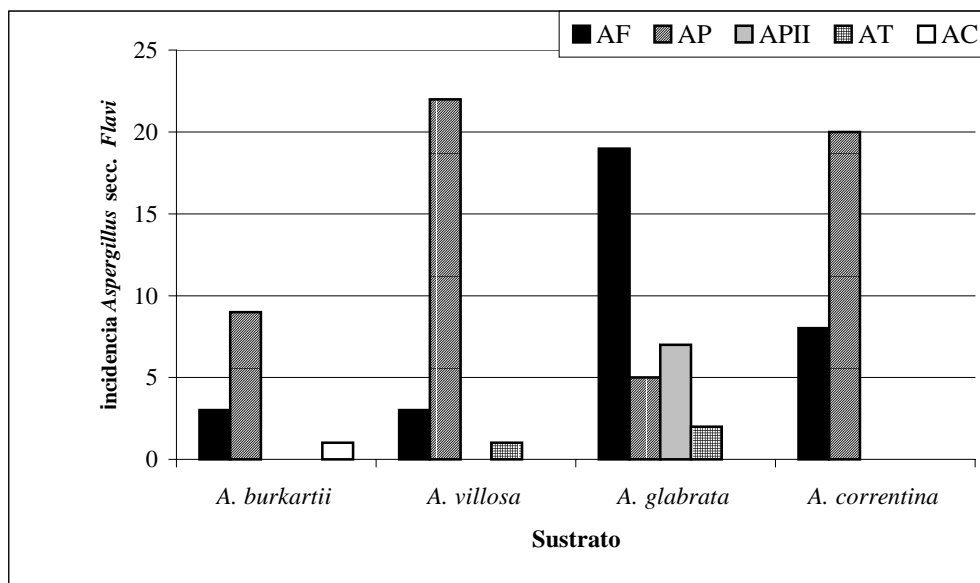
**Tabla 1.4.** Número de aislamientos de *Aspergillus* sección *Flavi* en hojas de maní cultivado y nativo.

Sitio	tipo de <i>Arachis</i>	Especie de <i>Arachis</i>	Especies de <i>Aspergillus</i> <sup>a</sup>					Total
			AF	AP	APII	AT	AC	
1		<i>A. villosa</i>	1	-	-	-	-	2
2		<i>A. villosa</i>	1	5	-	-	-	6
6		<i>A. villosa</i>	1	17	-	-	-	18
3		<i>A. burkartii</i>	-	3	-	-	-	3
4		<i>A. burkartii</i>	-	2	-	-	-	2
5		<i>A. burkartii</i>	-	4	-	-	-	4
13	<b>nativo</b>	<i>A. burkartii</i>	3	-	-	-	1	4
7		<i>A. glabrata</i>	-	2	3	2	-	7
8		<i>A. glabrata</i>	-	1	4	-	-	5
12		<i>A. glabrata</i>	19	2	-	-	-	21
9		<i>A. correntina</i>	7	17	-	-	-	24
10		<i>A. correntina</i>	1	1	-	-	-	2
11		<i>A. correntina</i>	-	2	-	-	-	2
14		<i>A. hypogaea</i>	7	-	-	-	-	7
15	<b>cultivado</b>	<i>A. hypogaea</i>	13	-	-	-	-	13
16		<i>A. hypogaea</i>	15	-	-	-	-	15
17		<i>A. hypogaea</i>	9	-	-	-	-	9
<b>Total</b>			<b>77a</b>	<b>56a</b>	<b>7b</b>	<b>3b</b>	<b>1b</b>	<b>144</b>

<sup>a</sup>Las abreviaturas son: AF (*A. flavus*); AP (*A. parasiticus*); APII (*A. parasiticus* tipo II); AT (*A. tamarii*); AC (*A. caelatus*).

<sup>b</sup>Las frecuencias con distintas letras difieren significativamente (anexo pag. III).

**Fig. 1.4.** Incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* ( $n= 100$ ) aisladas de hojas de plantas de *Arachis* nativo.



Las abreviaturas son: AF (*A. flavus*); AP (*A. parasiticus*); APII (*A. parasiticus* tipo II); AT (*A. tamarii*); AC (*A. caelatus*).

*A. glabrata* fue donde se observó la mayor diversidad y mayor número de aislamientos de especies de la sección *Flavi* (Fig. 1.4), mientras que de las hojas de *A. burkartii* fue de donde se obtuvo el menor número de aislamientos ( $n=13$ ). *A. parasiticus* fue aislado mayoritariamente de *A. villosa* y *A. correntina*, mientras que *A. flavus* se observó en mayor proporción en *A. glabrata* (Fig. 1.4). Los sitios 6, 9 y 12, donde se registraron las especies nativas *A. villosa*, *A. correntina* y *A. glabrata* respectivamente, fueron de donde se obtuvieron el mayor número de aislamientos. De los sitios 6 y 9 se aisló *A. parasiticus* en mayor frecuencia, mientras que en el sitio 12 la especie más frecuente fue *A. flavus* (Tabla 1.4).

La morfología observada para los aislamientos de las especies *A. parasiticus*, *A. tamarii* y *A. caelatus* concuerda con las descripciones de las especies (Pitt y Hocking, 1997; Horn, 1997). En el caso de *A. parasiticus*, 56 aislamientos de los 63 obtenidos también tienen características típicas de la especie (Pitt y Hocking, 1997). Sin embargo, los otros 7 restantes provenientes de los sitios 7 y 8 (*A. glabrata*) presentaron características morfológicas diferentes a las descritas para las especies identificadas de la sección *Flavi*, por lo cual se los denominó *A. parasiticus* II. Estos aislamientos presentan una morfología de la colonia similar a la de *A. caelatus*, mientras que la forma y ornamentación de los conidios resultaron intermedias entre *A. parasiticus* y *A. flavus* (Fig. 1.5). Los aislamientos de *A. parasiticus* II presentaron resultados negativos en AFPA, el reverso de la colonia se observó color castaño, diferente al naranja característico de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Este resultado indica que los aislamientos de *A. parasiticus* II no producen ácido aspergílico (Pitt *et al.*, 1983) (Fig. 1.5).



**Figura 1.5.** Características morfológicas de *A. parasiticus* II, en comparación con las de *A. parasiticus* y *A. caelatus*.

*A. parasiticus*

*A. caelatus*

*A. parasiticus* II

**A, D, G)** Colonia en CYA, AFPA y conidios de *A. parasiticus*. **B, E, H)** Colonia en CYA, AFPA y conidios de *A. caelatus*. **C, F, I)** Colonia en CYA, AFPA y conidios de *A. parasiticus*II.

## DISCUSIÓN

Se obtuvieron aislamientos de *Aspergillus* de la sección *Flavi* ( $n= 352$ ) de todas las zonas agroecológicas analizadas, tanto a partir de maní cultivado como nativo. *A. flavus* fue

la especie predominante (70.45%), seguido por *A. parasiticus* (26.13%), *A. tamaritii* (1.13%) y *A. caelatus* (0.28%). El 2% de los aislamientos, designados como *A. parasiticus* II, no pudo ser asignado a ninguna especie descrita. Estos resultados demuestran que *Aspergillus* sección *Flavi* se encuentra ampliamente distribuido en las zonas agroecológicas donde se cultiva maní en nuestro país, así como también en las especies nativas de *Arachis*. En estudios realizados para algodón y suelos cultivados con maní se obtuvieron frecuencias similares de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Cotty, 1997; Sétamou *et al.*, 1997; Cardwell y Cotty, 2002).

La presencia de *A. flavus* en hojas y semillas de maní cultivado durante la pre-cosecha, muestra que la infección con *Aspergillus* en el campo es común, confirmando la hipótesis de que la contaminación por *A. flavus* observada en maní durante el almacenamiento proviene en gran parte de la pre-cosecha como fue sugerido por Sétamou *et al.* (1997). Las especies nativas de *Arachis* podrían actuar como reservorios y puntos de inóculo de propágulos de los *Aspergillus* sección *Flavi* que pueden dispersarse desde los sustratos nativos a las áreas cultivadas. El hecho de que las dos especies de *Aspergillus* aisladas en la mayoría de los casos son altamente aflatoxigenicas, es una característica importante a considerar cuando se utilizan las especies silvestres de *Arachis* en agricultura sustentable, mejoramiento genético o como forrajeras.

Se ha postulado que unas de las vías de infección de maní en el campo por parte de *A. flavus* y *A. parasiticus* puede ser a través de las flores y ginóforos, (Hill *et al.*, 1985). En maíz se ha demostrado que las hojas son un punto de inóculo de *A. flavus* en el campo y en poroto se ha observado que esta especie puede causar clorosis en el ápice y el contorno de las mismas (Olanya *et al.*, 1997; Leger *et al.*, 2000). Además, en algodón se observó que *A. flavus* infecta el tallo y el pedicelo y crece unidireccionalmente hacia la flor, lo que indicaría que en el proceso de infección la presencia de *A. flavus* en los tejidos vegetativos de una planta estaría relacionada con la infección de la semilla (Klich *et al.*, 1986).

Las diferencias en la incidencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en semillas de las zonas agroecológicas analizadas puede ser explicada por las condiciones climáticas que prevalecen en cada una de ellas (Tabla 1.1), los cultivares, las prácticas agroecológicas y las

diferencias climáticas que pudieron existir entre los años muestreados. En cuanto a la presencia de *A. parasiticus* en semillas de maní cultivado, cabe destacar que para la variedad *Florunner*, cultivada en el 90% del área manisera (provs. Córdoba, Formosa y Salta), la incidencia de esta especie siempre fue menor a la de *A. flavus*. Para la provincia de Córdoba (Vaamonde *et al.*, 1995) de un total de 44 cepas aisladas, 9 fueron identificadas como *A. parasiticus* y las 35 restantes como *A. flavus*, esta relación se mantuvo en los aislamientos realizados para las provincias de Formosa y Salta (4 y 7 cepas de *A. parasiticus* de 40 y 118 aislamientos totales). En cambio para las semillas de la variedad *Valencia*, cultivada en la provincia de Corrientes, de un total de 38 cepas, 25 fueron identificadas como *A. parasiticus* y 13 como *A. flavus*, invirtiéndose la relación observada para el resto de las zonas maniseras. Las regiones de Tartagal y Las Lomitas son más secas que la región manisera de Corrientes, condiciones que hacen más propensas a las plantas de maní para la infección con *A. flavus* (Jones y Duncan, 1981; Sétamou *et al.*, 1997). Además, en la provincia de Corrientes se utiliza el cultivar *Valencia*, mientras que en el resto de la zona manisera se utiliza el *Florunner*; los cultivares varían principalmente en el contenido y tipo de ácidos grasos de la semilla, se ha comprobado que el contenido de ácido linoleico de la semilla induce la esporulación en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Xu *et al.*, 2000). En Corrientes el cultivo de maní se realiza en forma de “huerta” mezclado con otros cultivos como maíz, poroto, sandía y zapallo, esta práctica agro cultural es diferente al cultivo en Las Lomitas y Tartagal donde se realiza en forma extensiva. Barry *et al.* (1992) demostraron que la contaminación en maíz durante la pre-cosecha incluye varias relaciones complejas entre insectos, hongos, genotipos de maíz y el ambiente.

En maní, Horn (2005) sugirió que si bien las especies de *Aspergillus* sección *Flavi* pueden invadir tejido vivo, la colonización tiene más características de saprofítica que de una forma especializada de parasitismo. Si la relación hongo-hospedante es vista como saprofítica, luego la selectividad de las especies de la sección *Flavi* por las semillas de maní indica que estas especies tienen una alta “habilidad saprofítica competitiva”. La habilidad de competencia saprofítica en los hongos es compleja y depende de variables ambientales como la composición del sustrato, actividad agua, temperatura y densidad de inóculo. En adición a estos parámetros, las características fisiológicas propias de los hongos, como la tasa de germinación de las esporas, tasa de crecimiento de micelio y capacidad enzimática

tienen una gran influencia en dicha habilidad. La producción de diversas enzimas para degradar los componentes de las plantas, tales como celulosa, pectina, lignina y lípidos también contribuye a la ventaja competitiva de las especies de la sección *Flavi* que invaden las semillas de maní (Cotty *et al.*, 1990; Long *et al.*, 1998).

Este es el primer estudio sobre la presencia de especies de la sección *Flavi* en plantas de maníes nativos silvestres. Del análisis de los resultados se desprende que las hojas de especies nativas de *Arachis* son sustratos propicios para el crecimiento de varios representantes de la sección *Flavi*. La especie predominante es *A. parasiticus*, lo que difiere con lo encontrado en las hojas de los maníes cultivados desde donde sólo se aisló *A. flavus*. *A. parasiticus* ha sido citado como la especie dominante en aislamientos a partir de muestras de suelo y semillas de maní, pero raramente ha sido asociado con las partes aéreas de las plantas (Vaamonde *et al.*, 1995; Horn y Dorner, 1995; Cotty, 1997; Kumeda *et al.*, 2003; Horn, 2005).

*A. parasiticus* se aisló con mayor frecuencia a partir de hojas de las especies *A. villosa* y *A. correntina*, pero de las hojas de *A. glabrata* el organismo más frecuente fue *A. flavus*. *A. villosa* y *A. correntina* durante mucho tiempo fueron consideradas la misma especie, ambas pertenecen a la sección *Arachis* y son especies rastreras que desarrollan las hojas muy cercanas al suelo, mientras que *A. glabrata* pertenece a la sección *Rhizomatosae* y es relativamente más erecta, al igual que la variedad *Valencia* de *A. hypogaea* que es la que se cultiva en Corrientes (Krapovickas y Gregory, 1994). Esta podría ser una de las características que permitiría explicar la incidencia de *A. parasiticus* y *A. flavus* en las hojas, pero como esta es la primera vez que se realizan aislamientos a partir de estas especies nativas como también de hojas del maní cultivado y no hay referencias bibliográficas de los factores que pueden estar relacionados con la incidencia de estas especies en estos sustratos, es muy difícil establecer hipótesis sobre esta distribución. Serían necesarios otros estudios para corroborar la relación, aunque esta diferencia podría explicarse analizando las características fisiológicas de ambas hojas en términos de calidad y cantidad de nutrientes, pudiendo presentar, las de los maníes cultivados y *A. glabrata*, algún factor beneficioso para el desarrollo de *A. flavus* y no para otras especies del grupo, presentando a este último como un mejor competidor.

Otra característica que podría influir sobre la incidencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en hojas de maní cultivado y nativo podría ser las condiciones climáticas de los años muestreados ya que las campañas efectuadas se llevaron a cabo en Enero de 2004 para las plantas nativas y en Enero de 2005 para las cultivadas. En Diciembre de 2003, las precipitaciones en la zona de Corrientes fueron muy altas (435.6 mm) provocando un exceso de agua perjudicial para la actividad agrícola de la región (Olinuck, 2004), mientras que durante el Mes de Enero de 2004 el promedio fue el más bajo desde 1967 (24 mm). Para el mes de Diciembre de 2004, el promedio mensual de precipitaciones fue muy similar al de años anteriores (147.8mm) y en enero de 2005 también (Servicio Meteorológico Nacional, 2003-2005). Las temperaturas medias durante estos meses fueron acordes a la media esperada para la época del año (Servicio Meteorológico Nacional, 2003-2005), lo que sugiere que la característica climática que podría haber definido una dinámica poblacional diferente para cada especie de *Aspergillus* en hojas de plantas nativas y cultivadas sería el promedio de precipitaciones tan disímil entre los años evaluados.

*A. caelatus* es una especie aislada de suelo cultivado con maní en Estados Unidos (Horn, 1997) y hasta el momento no ha sido registrada en otras partes del mundo. En este estudio se observó su presencia a partir de aislamientos de hoja de *A. burckartii* en la provincia de Corrientes, constituyendo el primer registro para nuestro país y a partir de un sustrato diferente a aquel de donde fue aislada por primera vez.

Los aislamientos descritos como *A. parasiticus* II, obtenidos a partir de hojas de *A. glabrata*, con características morfológicas similares a *A. caelatus*, *A. parasiticus* y *A. flavus*, no pudieron ser incluidos dentro de ninguna especie descrita con anterioridad. Para su correcta identificación se requiere de más estudios, incluyendo datos morfológicos, moleculares y perfil de producción de metabolitos secundarios.

## CONCLUSIONES PARCIALES

- *Aspergillus* sección *Flavi* se encuentra ampliamente distribuido en las zonas agroecológicas donde se cultiva maní en nuestro país, así como también en las especies nativas de *Arachis*.

- *flavus* es la especie predominante en semillas y hojas de maní cultivado, mientras que *A. parasiticus* es la especie mas frecuente en hojas de maní nativo.
- Las especies nativas difieren en la diversidad y porcentaje de incidencia de *Aspergillus* de la sección, *Flavi*. *A. parasiticus* es la especie dominante en *A. villosa* y *A. correntina*, mientras que *A. flavus* es la mas frecuente en *A. glabrata*.
- La incidencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado se encuentra asociada a factores microclimáticos, prácticas agro culturales y cultivares propios de cada una de las zonas agroecológicas analizadas.



## INTRODUCCIÓN DE LA SECCION

Dentro de la especie *A. flavus*, los esclerocios son estructuras muy importantes del ciclo de vida, y han sido ampliamente utilizados como una de las características morfológicas relevantes en el estudio de las comunidades y subpoblaciones en diferentes regiones agroecológicas y en diferentes cultivos (Cotty 1989; Horn & Dorner 1999). El establecimiento de cepas S (esclerocios < 400 µm de diámetro) y L (esclerocios > 400 µm de diámetro), realizado por Cotty (1989), fue una interesante contribución para el estudio de la especie. Trabajos posteriores comenzaron a correlacionar la capacidad toxigénica de los aislamientos con la producción de esclerocios, demostrando que las denominadas cepas S generalmente producen grandes cantidades de aflatoxinas mientras que las cepas L producen, en promedio, menor concentración de aflatoxinas (Cotty, 1989; Bayman & Cotty, 1993). Numerosos estudios han demostrado la existencia de una relación entre la biosíntesis de aflatoxinas y esclerocios (Wicklow & Shotwell, 1983; Adams *et al.*, 1998).

La continua preocupación acerca del potencial efecto de las aflatoxinas en los alimentos incrementó el interés en el estudio de *A. flavus*. De acuerdo con Pitt (1993) *A. flavus* puede producir aflatoxinas tipo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) (AFB), o ácido ciclopiazónico (CPA), o ambos o ninguno, mientras que Saito *et al.* (1986) identificaron aislamientos de *A. flavus* productores de aflatoxinas tipo G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) (AFG) y Vaamonde *et al.* (2003) establecieron 5 quimiotipos para *A. flavus* analizando aislamientos procedentes de diversos cultivos de la Argentina (Tabla 2.1), demostrando una gran variabilidad en el potencial de producción de micotoxinas. Este conocimiento de los quimiotipos, de las diferencias regionales en la toxicidad de las poblaciones de *A. flavus*, como también de la asociación con el cultivo dominante de una región permiten determinar las medidas de control más efectivas para reducir la contaminación precosecha con aflatoxinas (Horn y Dorner , 1999).

La utilidad de la caracterización de las cepas de *A. flavus* para el manejo de la enfermedad, genera la necesidad del desarrollo de técnicas rápidas de determinación de potencial toxigénico. Filtenborg y Frisvad (1980) y Filtenborg *et al.* (1983) desarrollaron una técnica muy valiosa a la hora de analizar la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico de un alto número de cepas, esta técnica permite realizar un *screening* rápido de la capacidad toxigénica de un gran número de cepas en poco tiempo.



El manejo de la contaminación por aflatoxinas de los diferentes cultivos debe basarse en un conocimiento previo de las poblaciones del patógeno presentes en cada región. La capacidad de producción de estructuras de resistencia y toxinas por parte de los aislamientos de *A. flavus* constituyen algunas de las características más importantes a ser evaluadas.

**Tabla 2.1.** Quimiotipos de *A. flavus* basados en la producción de aflatoxinas y CPA (Vaamonde *et al.*, 2003).

Quimiotipo	Micotoxinas		
	<i>AFB</i>	<i>AFG</i>	<i>CPA</i>
<i>I</i>	+	-	+
<i>II</i>	+	+	+
<i>III</i>	+	-	-
<i>IV</i>	-	-	+
<i>V</i>	-	-	-

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la producción, contabilizar el número y el tamaño (L o S) de los esclerocios de las cepas de *A. flavus* aisladas a partir de plantas cultivadas y nativas de maní.
- Clasificar las cepas de *A. flavus* en tipos S y L.
- Determinar la capacidad aflatoxigénica y producción de ácido ciclopiazónico de las cepas de *A. flavus* aisladas a partir de plantas cultivadas y nativas de maní.
- Correlacionar la producción de aflatoxinas, la producción y tipo de esclerocios y las zonas agroecológicas de donde se obtuvieron las cepas analizadas.

## HIPÓTESIS

- *A. flavus* típicos, productores de esclerocios tipo L son los más frecuentes en plantas nativas y cultivadas de maní en la Argentina.
- Los aislamientos de *A. flavus* pertenecen en su mayoría al quimiotipo I (producción de aflatoxinas tipo B y CPA).
- Existe una correlación positiva entre la producción de esclerocios y aflatoxinas.

- Los aislamientos atípicos de *A. flavus*, productores de esclerocios tipo S, producen aflatoxinas tipo B y G.
- La producción de esclerocios y aflatoxinas se encuentran afectados por el sustrato y las condiciones ambientales.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Aislamientos de *A. flavus*

Para este estudio se utilizaron 248 aislamientos de *A. flavus*, provenientes de las provincias de Formosa, Salta, Entre Ríos y Corrientes, como se especifica en la Sección 1. Además se incluyeron 30 aislamientos de la provincia de Córdoba aislados por Vaamonde *et al.* (1995) y caracterizadas por compatibilidad vegetativa por Novas y Cabral (2002) (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Aislamientos de *A. flavus* ( $n= 278$ ). Procedencia geográfica y sustrato.

Zona agroecológica	Sustrato		
	Maní cultivado		Maní autóctono
	Semilla	Hoja	Hoja
<i>Córdoba</i>	30	-	-
<i>Formosa</i>	40	-	-
<i>Salta</i>	118	-	-
<i>Entre Ríos</i>	-	-	2
<i>Corrientes</i>	13	44	31

Debido a que los sitios de donde se aisló *A. flavus* dentro de la provincia de Entre Ríos pertenecen a la misma zona agroecológica que Corrientes (De Fina, 1992) y solo se aislaron 2 cepas, a partir de hojas de *A. villosa* (sección 1), se considera a E. Ríos y Corrientes como una misma zona agroecológica denominada “Corrientes”.

### 2. Producción de esclerocios, número y tamaño

Para obtener esclerocios de los aislamientos estudiados se inocularon cada uno en placas de Petri de 6 cm de diámetro (3 réplicas por aislamiento) conteniendo Cz-Dox e incubadas a 30°C en oscuridad durante 14 días. Cuando un aislamiento no producía esclerocios bajo las condiciones de cultivo utilizadas, se lo inoculaba en erlenmeyers

conteniendo semillas de maní y agua destilada, previamente autoclavado, durante 14 días a 25°C, para luego volverlo a inocular en placas de Petri conteniendo Cz-Dox e incubadas a 30°C. Si luego de este tratamiento el mismo seguía sin producir esclerocios, consideramos que bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio el aislamiento no es capaz de producir esclerocios.

Para contar y medir el tamaño de los esclerocios fue necesario separarlos del micelio y los conidios. Para ello se colocaron 5ml de Tween 20 (100µl/l) en cada una de las placas de Petri y se raspó la superficie con espátula de Drigalsky. Luego se filtró con papel y se lavaron los esclerocios repetidas veces con agua destilada para separarlos de los conidios y finalmente se secaron al aire sobre papel de filtro.

Para medir el diámetro de los esclerocios, fueron dispersados sobre una caja de Petri de 6 x 1.5 cm con una cuadrícula de 1 cm de lado y se tomó el diámetro de 30 esclerocios por réplica, asumiendo que la forma de los esclerocios es aproximadamente esférica. Los aislamientos productores de esclerocios fueron clasificados como S o L (Cotty, 1989; Novas & Cabral, 2002).

### **3. Capacidad toxigénica. Producción de aflatoxinas tipo B y G y ácido ciclopiazónico**

Para la detección de las micotoxinas producidas por los aislamientos en estudio se utilizó el método de *plug*, método rápido de *screening*, para micotoxinas extracelulares e intracelulares desarrollado por Filtenborg y Frisvad (1980) y modificaciones de Filtenborg *et al.* (1983) en cromatografía en capa delgada.

Las cepas de *A. flavus* se cultivaron en agar CYA durante 7-10 días a 25°C. Una vez finalizado este lapso se cortaron con un sacabocado cuatro cilindros de 5mm de diámetro (*plug*) de cada una de las colonias. Para la detección de aflatoxinas se colocaron dos *plugs* de cada cepa sobre un cromatofolio de sílica gel 60 con el agar contra el gel y se dejó secar la mancha antes de desarrollar la placa. Como solvente de desarrollo se utilizó una mezcla de cloroformo-acetona (90+10).

Para la detección de CPA, se colocaron dos *plugs* de cada cepa sobre un cromatofolio de sílica gel 60 con el micelio contra el gel. En este caso, se agregaron una o dos gotas de cloroformo al micelio previa aplicación del *plug* en la placa cromatográfica para extraer la toxina. Luego de la aplicación se dejó secar la mancha y se desarrolló la

placa. Esta fue previamente sumergida en una solución de ácido oxálico 10% en metanol y secada en estufa a 100°C y el solvente de desarrollo fue una mezcla de tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) (Fernández Pinto *et al.*, 2001).

Las aflatoxinas se visualizaron bajo luz UV (366 nm) como manchas azules (AFB) o verdes (AFG) y el CPA bajo luz visible luego del tratamiento de las placas con reactivo de Erlich (anexo Pag. II) y el subsecuente desarrollo de manchas azules como reacción característica de producción de CPA visualizadas con luz natural. Los resultados negativos o dudosos para aflatoxinas fueron confirmados empleando arroz como sustrato según la técnica de Shotwell *et al.*, (1966) y con maní como sustrato para el caso del CPA, empleando la técnica de Fernández Pinto *et al.*, (2001).

Para evaluar la producción de CPA en maní se tomaron 25 g de material, se le agregaron 10 ml de agua destilada y se autoclavó a 121°C durante 30 minutos. A los granos así tratados se los inoculó con 1 ml de una suspensión de esporas de la cepa en estudio ( $10^6$  esporas/ml) preparada según Pitt y Hocking (1997) y se incubó durante 7 días a 30°C. Luego de la incubación se agregaron 125 ml de una mezcla de metanol-agua (55+45), 0,5 ml de ácido fosfórico 85% y 50 ml de hexano. La mezcla se homogeneizó en licuadora a elevada velocidad durante dos minutos y se filtró. Se tomaron 25 ml de la fase acuosa y se extrajeron dos veces con 25 ml de cloroformo. El extracto se llevó a sequedad en evaporador rotatorio a 60°C y presión reducida. El extracto seco se redisolvió en el volumen de cloroformo adecuado y se sembró en el cromatofolio. El solvente de desarrollo y las condiciones de visualización fueron las mismas que las empleadas en el método del *plug*.

#### 4. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas apropiadas se eligieron teniendo en cuenta que los datos a analizar son variables categóricas, datos de frecuencia clasificados en clases excluyentes y en escala nominal. Para estudiar una posible asociación entre la producción de esclerocios y la producción de aflatoxinas por parte de *A. flavus*, con la procedencia de las semillas y hojas de maní contaminados se realizó un test no paramétrico de asociación por rangos para tablas de  $r \times c$  utilizando el programa Statistix for Windows version 2.1 Analytical software para la prueba de independencia  $\chi^2$  ( $P= 0.05$ ) y el programa Biom (Applied Biostatistics,

Inc., Setanket, NY 11733 USA) (Sokal & Rohlf, 1981) para la prueba  $G$  para tablas de  $r \times c$  ( $P= 0.05$ ), cumpliendo los supuestos de muestra aleatoria, independencia, categorías mutuamente excluyentes y escala nominal. Del test de asociación por rangos se obtienen subtablas no significativas a partir de las cuales se desprenden las que pueden resultar significativas.

Para el análisis de la existencia de asociación entre la producción de esclerocios y aflatoxinas de *A. flavus*, con la especie de maní (plantas cultivadas o nativas) para la provincia de Corrientes se utilizó la prueba de independencia  $\chi^2$  ( $P= 0.05$ ) del programa Statistix for Windows version 2.1 Analytical software. Esta misma prueba se utilizó además para comparar producción de esclerocios y aflatoxinas de cepas de *A. flavus* procedentes de hojas y semillas de maní cultivado para la provincia de Corrientes.

Para el estudio de una posible asociación entre la producción de aflatoxinas y producción de estructuras de resistencia de *A. flavus*, se utilizó el coeficiente de correlación  $\phi$  por rangos para datos dicotómicos ( $P<0.05$ ) y la prueba de independencia  $\chi^2$  ( $P= 0.05$ ). Los datos cumplieron con los supuestos de la prueba (muestra aleatoria, independencia y datos dicotómicos) (Sokal & Rohlf, 1981). El programa empleado fue Statistix for Windows version 2.1 Analytical software.

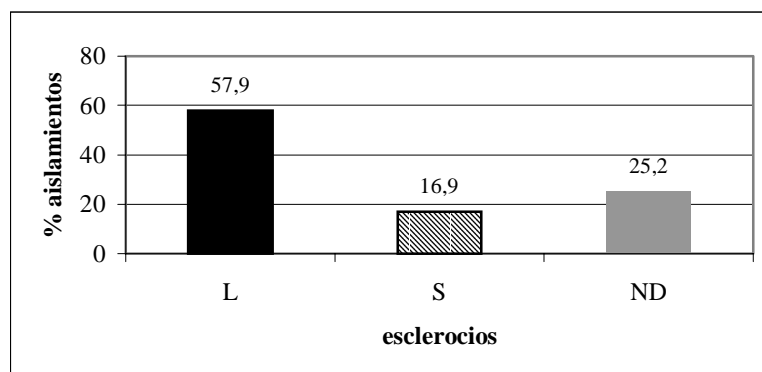
## RESULTADOS

### 1. Producción de esclerocios

El 75% de las cepas de *A. flavus* analizadas en este estudio ( $n= 278$ ) produce esclerocios bajo nuestras condiciones de cultivo. De este porcentaje, el 22.6% de los aislamientos fue clasificado como tipo S (diámetro de esclerocios  $< 400 \mu\text{m}$ ). La proporción de aislamientos productores de esclerocios fue mayor que la de no productores, siendo los de tipo L los más frecuentes (Fig. 2.1). La producción de esclerocios y el tipo varió entre las zonas agroecológicas analizadas, la Tabla 2.3 y la Figura 2.2 muestran las frecuencias y el porcentaje de aislamientos productores de esclerocios (tipo L y S) o no productores de donde se desprende que en la zona de Corrientes no se aisló ninguna cepa productora de esclerocios tipo S. La morfología de los cultivos productores de esclerocios

resultó diferente, se observaron cepas con alto número de esclerocios L, otras con menor número pero mayor producción de conidios, y las cepas S con alto número de esclerocios pequeños y muy baja producción de conidios (Figura 2.3).

**Figura 2.1.** Porcentaje de aislamientos de *A. flavus* (n= 278) productores de esclerocios L, S y no productores



L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

**Tabla 2.3.** Producción de esclerocios por aislamientos de *A. flavus* (n= 278) de las 4 zonas agroecológicas analizadas.

<i>Zona agroecológica</i>	<i>Producción de esclerocios<sup>a</sup></i>		
	L	S	ND
<i>Córdoba<sup>b</sup></i>	13	8	9
<i>Formosa</i>	28	3	9
<i>Salta</i>	47	36	35
<i>Corrientes</i>	73	-	17
<b>Total</b>	161	47	70

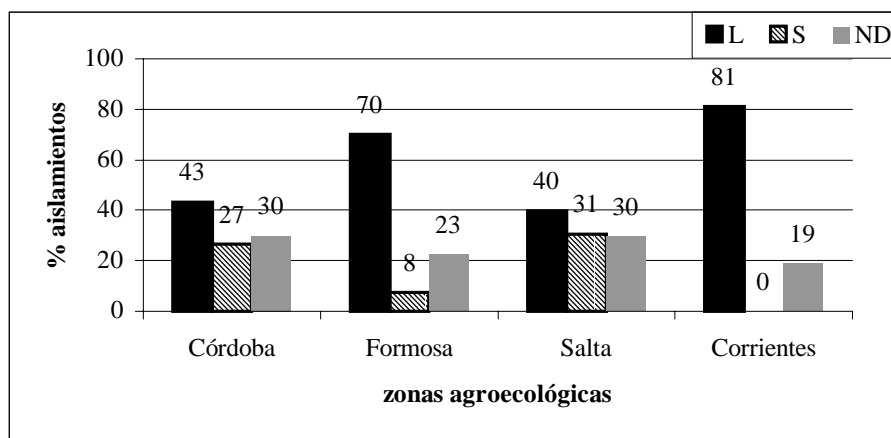
<sup>a</sup>L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

<sup>b</sup>Los datos para la provincia de Córdoba fueron obtenidos de Vaamonde, *et al.* (1995) y Novas y Cabral (2002).

La prueba de independencia  $\chi^2$  (anexo pag. III) muestra que las zonas agroecológicas presentan diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de aislamientos productores de esclerocios ( $\chi^2 = 43.40$ ;  $P < 0.0001$ ). Pero esta prueba no permite inferir donde se encuentran estas diferencias, por lo cual se realizó la prueba G para tablas de  $3 \times 4$  donde del análisis de subtablas no significativas se establecen aquellas relaciones significativas con sentido biológico (anexo pag. III).

Las subtablas resultantes de dividir este test muestran que existe diferencia significativa en las frecuencias de los aislamientos de las cepas S. En Salta la frecuencia de aislamientos de este tipo es significativamente mayor que en el resto de las zonas (Tabla 2.3). Además, se desprende que existen diferencias significativas entre Corrientes y el resto de las zonas analizadas para los aislamientos tipo L, ya que para este área, la frecuencia de aislamientos productores de este tipo de esclerocios es muy alta (Tabla 2.3), observándose un porcentaje superior al 80% (Fig. 2.2). Otro resultado se observa para la relación entre Córdoba y Corrientes y entre Salta y Corrientes donde existen diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de aislamientos productores de ambos tipos de esclerocios y no productores. Esta relación es evidente al observar la Figura 2.2 donde para Córdoba y Salta los porcentajes de los 3 tipos de aislamientos son similares (43%-27%-30% y 40%-31%-30% respectivamente) mientras que en Corrientes los aislamientos productores de esclerocios tipo L se presentan en mayor porcentaje que los no productores de esclerocios (81% - 19%) y las cepas S no se aislaron en ninguno de los muestreos.

**Figura 2.2.** Producción de esclerocios por aislamientos de *A. flavus* en las 4 zonas agroecológicas analizadas.



L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

Los datos para la provincia de Córdoba fueron obtenidos de Vaamonde, *et al.* (1995) y Novas y Cabral (2002).

**Figura 2.3.** Morfología de los cultivos de *A. flavus* productores de esclerocios tipo L y S.

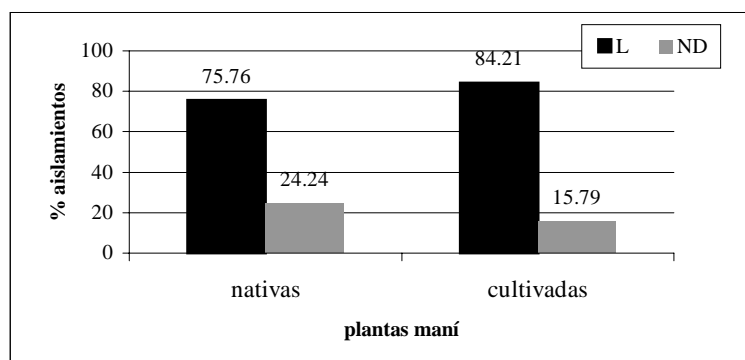
**A)** Colonia de *A. flavus* con esclerocios tipo L. **B)** Colonia de *A. flavus* con esclerocios tipo S. **C)** Esclerocios tipo L. **D)** Esclerocios tipo S.

Cuando se comparó la frecuencia de cepas de *A. flavus* productoras de esclerocios y no productoras provenientes de las plantas de maní nativo y cultivado de la zona de Corrientes, la prueba  $\chi^2$  ( $P= 0.05$ ) (anexo pag. IV) arrojó un resultado no significativo ( $\chi^2= 0.97$ ;  $P= 0.3235$ ). Esto indica que la frecuencia de cepas productoras de esclerocios en las plantas nativas es similar a la de cepas de plantas cultivadas, y esta misma relación se cumple para las cepas no productoras de esclerocios. Con excepción del sitio 1 (*A. villosa*, un aislamiento), para todos los demás sitios muestreados de donde se obtuvo *A. flavus*, el porcentaje de aislamientos productores de esclerocios fue mayor que el de no productores (Tabla 2.4). Los porcentajes de aislamientos de hojas productores de esclerocios, tanto de plantas nativas como cultivadas, fueron superiores al 65%, mientras que para los



aislamientos de las semillas de maní cultivado (*Ahs*) el número de productores y no productores es muy similar (53.8 y 46.2% respectivamente) (Figura 2.5). Al comparar la producción de esclerocios entre los aislamientos de hojas y semillas del sitio 15, se obtuvo como resultado que existen diferencias significativas ( $\chi^2 = 4.89$ ;  $P = 0.0271$ ) (anexo pag. IV) en la producción de esclerocios entre aislamientos provenientes de hojas y semillas de las plantas cultivadas.

**Figura 2.4.** Porcentaje de aislamientos de *A. flavus* ( $n = 90$ ) productores de esclerocios en hojas de plantas de maní nativo y cultivado de la provincia de Corrientes.



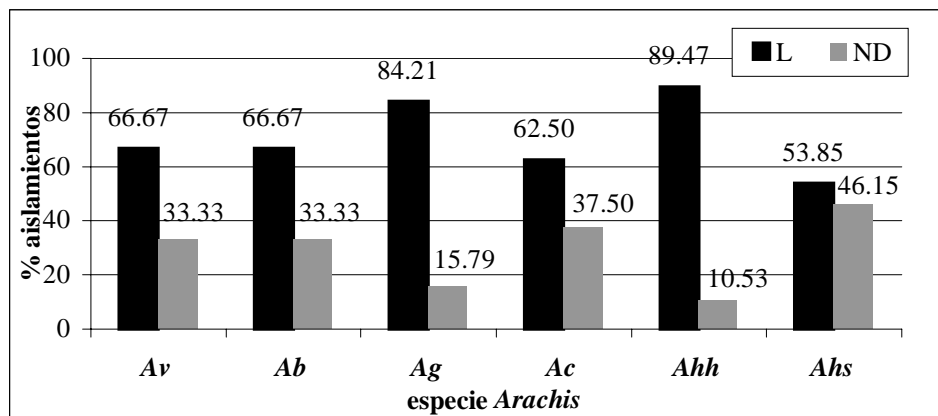
L: esclerocios >400 $\mu$ m de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

**Tabla 2.4.** Producción de esclerocios por *A. flavus* ( $n = 90$ ) aislados de los distintos sitios analizados para Corrientes.

Sitio	Especie de <i>Arachis</i>	Producción de esclerociosa		Frec. total
		%L	ND	
1	<i>A. villosa</i>	-	100	1
2	<i>A. villosa</i>	100	-	1
6	<i>A. villosa</i>	100	-	1
13	<i>A. burkartii</i>	66.7	33.3	3
12	<i>A. glabrata</i>	84.2	15.8	19
9	<i>A. correntina</i>	57.1	42.9	7
10	<i>A. correntina</i>	100	-	1
14	<i>A. hypogaea</i>	100	-	7
15	<i>A. hypogaea</i>	73.1	26.9	26
16	<i>A. hypogaea</i>	93.3	6.7	15
17	<i>A. hypogaea</i>	77.8	22.2	9
<b>Frec. Total</b>		<b>73</b>	<b>17</b>	<b>90</b>

<sup>a</sup>L: esclerocios >400 $\mu$ m de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

**Figura 2.5.** Producción de esclerocios por *A. flavus* de Corrientes ( $n= 90$ ) en relación con el sustrato de donde fueron aislados.



L: esclerocios  $>400\mu\text{m}$  de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.  
 Av: *A. villosa*; Ab: *A. burkartii*; Ag: *A. glabrata*; Ac: *A. correntina*; Ahh: *A. hypogaea* (hojas); Ahs: *A. hypogaea* (semillas).

## 2. Capacidad toxigénica. Producción de aflatoxinas tipo B y G y ácido ciclopiazónico

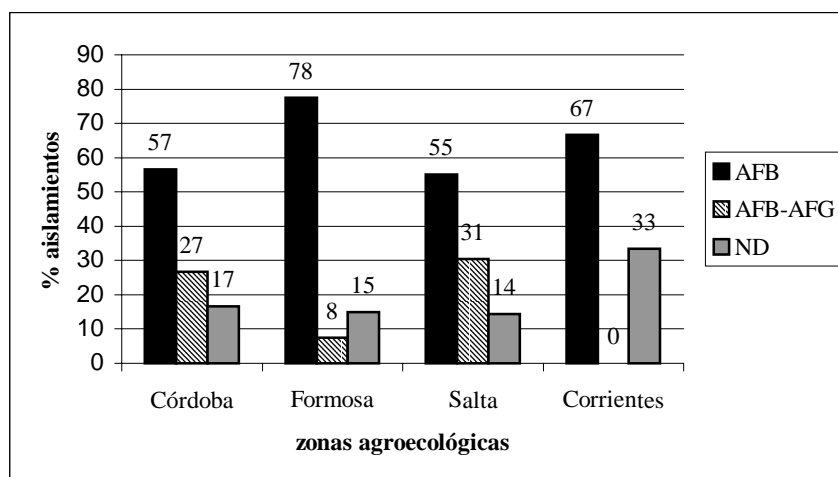
El porcentaje de las cepas aflatoxigénicas en las áreas analizadas es de 79%. De este valor el 78.6% produce AFB y el 21.4% restante AFB y AFG, mientras que para la producción de CPA el porcentaje de cepas es de 97.8% (incluye aislamientos de quimiotipos I, II y IV). Un aislamiento de Córdoba y 5 de Corrientes (2 provenientes de plantas nativas y 3 de cultivadas), no produjeron aflatoxinas ni CPA, por lo que fueron incluidos en el quimiotipo V (Tabla 2.5). La totalidad de los aislamientos productores de aflatoxinas produjeron también CPA. De los cinco quimiotipos establecidos por Vaamonde *et al.* (2003) (pag. 57), el que se presenta en mayor frecuencia es el I (AFB y CPA) con el 62% de los aislamientos seguido por el IV (solo CPA) y el II (AFB, AFG y CPA) con el 18.7% y 16.9% respectivamente (Tabla 2.5). Cabe destacar que el quimiotipo III (Aflatoxinas sin CPA) no se encuentra representado en las zonas analizadas.

**Tabla 2.5.** Quimiotipos de *A. flavus* observados para las áreas agroecológicas analizadas, basados en la producción de aflatoxinas y CPA.

<i>Zona agroecológica</i>	<i>Quimiotipo<sup>a</sup></i>				
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
<i>Córdoba</i>	17	8	-	4	1
<i>Formosa</i>	31	3	-	6	-
<i>Salta</i>	65	36	-	17	-
<i>Corrientes</i>	60	-	-	25	5
<b><i>Total</i></b>	<b>173</b>	<b>47</b>	<b>0</b>	<b>52</b>	<b>6</b>

<sup>a</sup>Quimiotipos: *I* (AFB y CPA); *II* (AFB, AFG y CPA); *III* (AFB sin CPA); *IV* (solo CPA); *V* (son producción de aflatoxinas ni CPA).

**Figura 2.6.** Producción de aflatoxinas tipo B y G por aislamientos de *A. flavus* de las 4 zonas agroecológicas analizadas.



ND: no se detectó la producción de aflatoxinas bajo nuestras condiciones de análisis. ND incluye a cepas que producen solo CPA como también a aquellas que no lo producen.

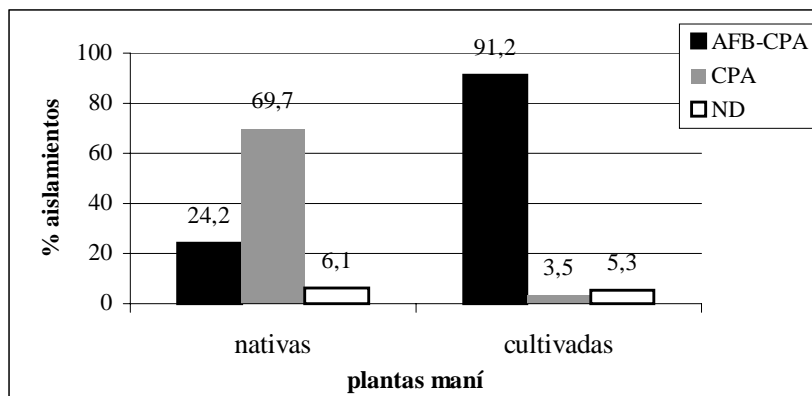
Los datos para la provincia de Córdoba fueron obtenidos de Vaamonde, *et al.* (1995) y Novas y Cabral (2002).

La prueba de independencia  $\chi^2$  (anexo pag. IV) muestra que las zonas agroecológicas presentan diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de aislamientos productores de aflatoxinas ( $\chi^2 = 41.71$ ;  $P < 0.0001$ ). Para determinar donde se encuentran estas diferencias se realizó la prueba *G* para tablas de  $3 \times 4$ , al igual que para esclerocios (anexo pag. IV). Las subtablas resultantes muestran que existe diferencia significativa en las frecuencias de los aislamientos de las cepas productoras de AFB-AFG entre las áreas analizadas (Tabla 2.5), en Córdoba y Salta el porcentaje de aislamientos de

este tipo es mayor que en Formosa, y en Corrientes no se aislaron cepas productoras de ambas aflatoxinas (Figura 2.6). Además del análisis se desprende que existen diferencias significativas entre Corrientes y el resto de las zonas analizadas para ya que el perfil de producción es diferente (Figura 2.6). Las zonas de Córdoba y Salta presentan el mismo perfil de producción de aflatoxinas, donde el quimiotipo más frecuente es el I, seguido por el II y por último el IV (57%-27%-17% y 55%-31%-14%, respectivamente), mientras que para Formosa el IV es más frecuente que el II y en Corrientes este último no presenta ningún aislamiento asociado (Tabla 2.5, Figura 2.6).

Los aislamientos obtenidos en la zona de Corrientes pertenecen en su mayoría al quimiotipo I. Cuando se comparó la distribución de las cepas provenientes de plantas nativas y cultivadas entre los diferentes quimiotipos se registró que en las cultivadas el quimiotipo I es el que tiene mayor porcentaje de aislamientos, no así en las nativas donde el mayor porcentaje de aislamientos lo tiene el quimiotipo IV (Figura 2.7). Al analizar estadísticamente la frecuencia de cepas productoras de aflatoxinas, CPA y no productoras provenientes de las plantas de maní nativo y cultivado dentro del área de Corrientes, la prueba  $\chi^2$  ( $P= 0.05$ ) (anexo pag. IV) arrojó un resultado significativo ( $\chi^2= 47.57$ ;  $P < 0.0001$ ) y los resultados de la prueba  $G$  para tablas de  $3 \times 2$  (anexo pag. IV) indican que existen diferencias significativas en la frecuencia de cepas productoras de CPA solamente (quimiotipo IV) ya que el número de aislamientos de las plantas nativas productoras de este metabolito sin estar acompañado por la producción de aflatoxinas es mayor que para las cultivadas (Figura 2.7). Otro resultado significativo se observa entre las frecuencias de las cepas productoras de aflatoxinas tipo B y CPA (quimiotipo I) de las plantas cultivadas y las nativas, ya que el número de este tipo de aislamientos es mayor en las cultivadas (Figura 2.7).

**Figura 2.7.** Capacidad toxigénica de aislamientos de *A. flavus* provenientes de plantas nativas y cultivadas de maní en la zona de Corrientes.



ND: no se detectó la producción de aflatoxinas ni CPA bajo nuestras condiciones de análisis.

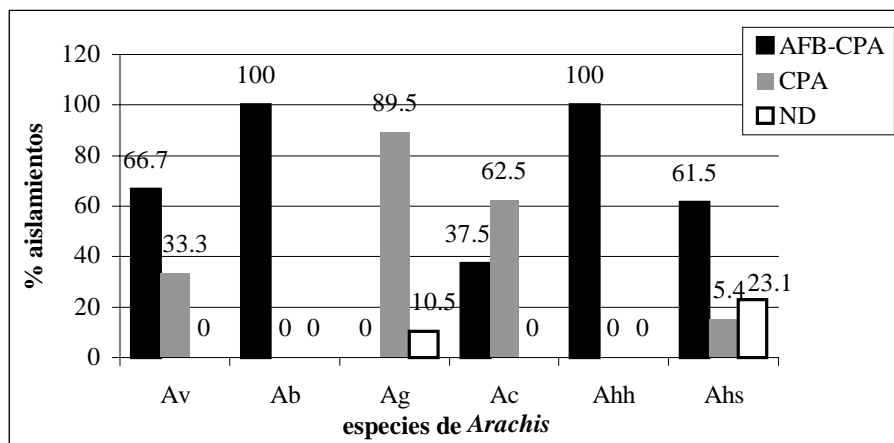
En los sitios de plantas nativas de donde se obtuvieron aislamientos de *A. flavus*, el número de cepas productoras de aflatoxinas fue variable. En los sitios 12 y 9 (*A. glabrata* y *A. correntina* respectivamente) la frecuencia de aislamientos productores de CPA solamente fue mayor a la de cepas productoras de ambas toxinas (Tabla 2.6). Mientras que los aislamientos provenientes de los sitios de las plantas cultivadas resultaron en su mayoría (92.2%) productores de AFB y CPA, aquellos obtenidos a partir de hojas resultaron en su totalidad productores de AFB y CPA a diferencia de los obtenidos a partir de semillas (Fig. 2.8, *Ahh*) donde el 61.5% produce aflatoxinas y el 38.5 solo CPA o ninguno de los 2 extrolitos (Fig. 2.8).

**Tabla 2.6.** Distribución en quimiotipos de aislamientos de *A. flavus* ( $n= 90$ ) de los distintos sitios analizados para Corrientes.

Sitio	Especie de <i>Arachis</i> <sup>b</sup>	Quimiotiposa			Frec. Total
		%I	%IV	%V	
1	<i>A. villosa</i>	100	-	-	1
2	<i>A. villosa</i>	-	100	-	1
6	<i>A. villosa</i>	100	-	-	1
13	<i>A. burkartii</i>	100	-	-	3
12	<i>A. glabrata</i>	-	89.5	10.5	19
9	<i>A. correntina</i>	42.9	57.1		7
10	<i>A. correntina</i>	-	100		1
14	<i>A. hypogaea</i>	100	-	-	7
15	<i>A. hypogaea</i>	80.8	7.7	11.5	26
16	<i>A. hypogaea</i>	100	-	-	15
17	<i>A. hypogaea</i>	100	-	-	9
<b>Frec. Total</b>		<b>60</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>90</b>

<sup>a</sup>Solo se incluyeron los quimiotipos observados para la zona de Corrientes, los quimiotipos II y III no tuvieron aislamientos asociados. Quimiotipos: I (AFB y CPA); II (AFB, AFG y CPA); III (AFB sin CPA); IV (solo CPA); V (son producción de aflatoxinas ni CPA).

**Figura 2.8.** Producción de aflatoxinas y CPA por *A. flavus* de Corrientes ( $n= 90$ ) en relación con el sustrato de donde fueron aislados.



ND: no se detectó la producción de aflatoxinas ni CPA bajo nuestras condiciones de análisis.

Av: *A. villosa*; Ab: *A. burkartii*; Ag: *A. glabrata*; Ac: *A. correntina*; Ahh: *A. hypogaea* (hojas); Ahs: *A. hypogaea* (semillas).

### 3. Relación entre la producción de esclerocios y aflatoxinas

Al analizar los aislamientos teniendo en cuenta su quimiotipo, la producción y el tipo (L o S) de esclerocios, se observa que en todas las zonas analizadas los aislamientos del quimiotipo I capaces de producir esclerocios son los más frecuentes, seguidos por los de tipo II productores de esclerocios S, y por los no productores de esclerocios que presentan quimiotipo IV en su mayoría o I. Por otra parte los aislamientos productores de esclerocios tipo L pertenecen principalmente al quimiotipo I, pero también existen aislamientos con quimiotipo IV, aunque no se observaron del quimiotipo II (Tabla 2.7 y Fig. 2.9).

Todos los aislamientos pertenecientes al quimiotipo II producen esclerocios S y viceversa. A excepción de Formosa, en todas las otras áreas analizadas, la proporción de aislamientos no productores de esclerocios con quimiotipo I es mayor que los de quimiotipo IV (Tabla 2.7 y Fig. 2.9).

Para las zonas de Formosa y Salta, los aislamientos no productores de esclerocios con quimiotipo IV son más abundantes que los productores de esclerocios con este mismo quimiotipo. Para el área de Córdoba, el porcentaje es el mismo entre ambas categorías, pero para Corrientes, esta relación es inversa, los aislamientos productores de esclerocios con quimiotipo IV son más abundantes que los no productores de esclerocios con este mismo quimiotipo.

**Tabla 2.7.** Producción de esclerocios y quimiotipos establecidos para los aislamientos de *A. flavus* de cada una de las zonas agroecológicas analizadas.

Quimiotipo	Producción de esclerocios por Zona Agroecológica (%)											
	Córdoba (n= 30)			Formosa (n= 40)			Salta (n= 118)			Corrientes (n= 90)		
	L	S	ND	L	S	ND	L	S	ND	L	S	ND
I	40	-	16.7	65	-	12.5	34.7	-	20.3	57.8	-	8.9
II	-	26.7	-	-	7.5	-	-	30.5	-	-	-	-
IV	3.3	-	3.3	5	-	10	5.1	-	9.3	23.3	-	4.4
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.6

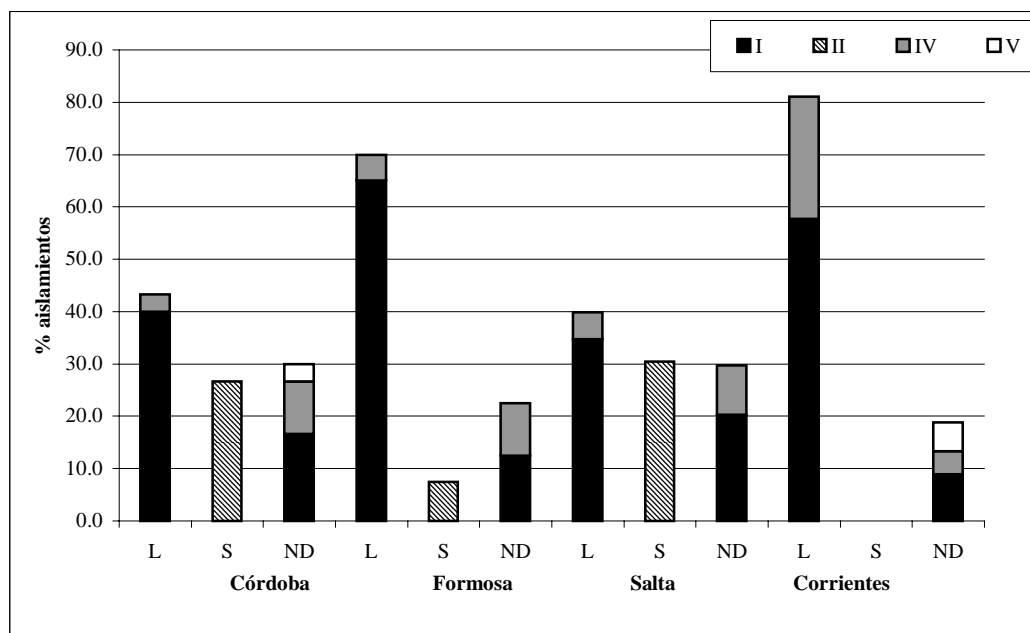
<sup>a</sup>No se incluyó el quimiotipo III ya que no hay aislamientos que presente esta combinación. Quimiotipos: I (AFB y CPA); II (AFB, AFG y CPA); III (AFB sin CPA); IV (solo CPA); V (son producción de aflatoxinas ni CPA).

<sup>b</sup>ND: no hubo producción de esclerocios bajo nuestras condiciones de cultivo.

Los resultados del análisis de producción de esclerocios y aflatoxinas se resumen en la Tabla 2.8, donde se puede observar que el 63.7% de los aislamientos es capaz de producir aflatoxinas (AFB o AFB-AFG) y esclerocios, mientras que el 36.3 % restante está compuesto por aislamientos productores de aflatoxinas pero no de esclerocios o no

productores de ninguna de las 2 características analizadas. Del análisis estadístico para comprobar si existe una asociación positiva entre la producción de aflatoxinas y la producción de estructuras de resistencia se desprende que esta hipótesis es verdadera ( $\phi=0.67$ ;  $\chi^2=22.29$ ;  $P<0.005$ ) (anexo pag. V). Otro resultado general es que el 100% de los productores de AFB y AFG presenta esclerocios tipo S y viceversa. Además, todas las cepas con quimiotipo V no resultaron capaces de producir esclerocios.

**Figura 2.9.** Incidencia de cepas L, S y no productoras de esclerocios y su relación con los quimiotipos.



<sup>a</sup>No se incluyó el quimiotipo III ya que no hay aislamientos que presente esta combinación. Quimiotipos: I (AFB y CPA); II (AFB, AFG y CPA); III (AFB sin CPA); IV (solo CPA); V (son producción de aflatoxinas ni CPA).

<sup>b</sup>ND: no hubo producción de esclerocios bajo nuestras condiciones de cultivo.



**Tabla 2.8.** Producción de esclerocios relacionada con los quimiotipos establecidos para aislamientos de *A. flavus* ( $n= 278$ ) de maní nativo y cultivado en la Argentina.

<b>Producción esclerocios</b>	<b>Quimiotipos<sup>a</sup> (%)</b>			
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>L</b> ( $n= 161$ )	46.8	-	11.2	-
<b>S</b> ( $n= 47$ )	-	16.9	-	-
<b>ND<sup>b</sup></b> ( $n= 70$ )	14.4	-	8.6	2.2

<sup>a</sup>No se incluyó el quimiotipo III ya que no hay aislamientos que presenten esta combinación. Quimiotipos: *I* (AFB y CPA); *II* (AFB, AFG y CPA); *III* (AFB sin CPA); *IV* (solo CPA); *V* (son producción de aflatoxinas ni CPA).

<sup>b</sup>ND: no hubo producción de esclerocios bajo nuestras condiciones de cultivo.

Al estudiar la relación entre los quimiotipos y esclerocios para los aislamientos de *A. flavus* provenientes de plantas nativas y cultivadas de Corrientes se observó que las cepas con esclerocios tipo L, provenientes de plantas nativas, se incluyen mayoritariamente dentro del quimiotipo IV, mientras que aquellos aislamientos de plantas cultivadas se incluyen dentro del quimiotipo I (Tabla 2.9). Además, todas las cepas de *A. flavus* con quimiotipo V, aisladas de ambos sustratos, no resultaron capaces de producir esclerocios.

**Tabla 2.9.** Producción de esclerocios relacionada con los quimiotipos establecidos para aislamientos de *A. flavus* provenientes de plantas nativas y cultivadas de la zona de Corrientes.

<b>Quimiotipos<sup>a</sup></b>	<b>Producción de esclerocios por sustrato (%)</b>			
	Plantas nativas		Plantas cultivadas	
	<b>L</b>	<b>ND</b>	<b>L</b>	<b>ND</b>
<b>I</b>	12.1	12.1	84.2	7
<b>IV</b>	63.6	6.1	-	3.5
<b>V</b>	-	6.1	-	5.3

<sup>a</sup>No se incluyeron los quimiotipos II y III ya que no hay aislamientos que presenten esta combinación. Como tampoco se incluyeron los esclerocios tipo S ya que para esta zona no se aisló ninguna cepa con estas características.

<sup>b</sup>ND: no hubo producción de esclerocios bajo nuestras condiciones de cultivo.

## DISCUSION

La presente sección contribuye al conocimiento de la biodiversidad poblacional de *A. flavus* en la Argentina, presentando una caracterización morfológica, a través de la producción de esclerocios, y toxigénica de los aislamientos de este patógeno a partir de

semillas y hojas de maní procedentes de diferentes regiones agroecológicas. Es el primer registro presentado para las provincias de Formosa, Salta y Corrientes, mientras que para la provincia de Córdoba aporta nuevos datos y relaciona observaciones realizadas con anterioridad (Vaamonde *et al.*, 1995; Novas y Cabral, 2002; Pildain *et al.*, 2004; Pildain *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio indican que los aislamientos tipo L son los más comunes en las poblaciones de *A. flavus* de las áreas analizadas, esto concuerda con análisis realizados en otros países y sobre diferentes sustratos, mostrando que los *A. flavus* “típicos” son productores de esclerocios mayores a 400  $\mu\text{m}$  de diámetro (Setamou *et al.*, 1997; Cotty, 1997; Horn y Dorner, 1999; Barros *et al.*, 2003). La incidencia de las cepas S en nuestras zonas maniseras es notable, aunque siempre mucho menor que la de las cepas L, siendo similar en las áreas de Córdoba y Salta mientras que para Formosa el número de aislamientos disminuye y en la zona de Corrientes no se aislaron cepas de este tipo. La variable temporal explica relativamente poco en este estudio ya que los porcentajes de incidencia de las cepas S para las provincias de Salta y Córdoba, muestreadas en diferentes años (1995, 2001 respectivamente) presentan valores muy similares (27 y 31% respectivamente). Esto también puede observarse en cuanto a la proporción de las cepas L entre las diferentes áreas, sin importar el año de muestreo o las condiciones microecológicas de cada área, estas cepas se presentan siempre en mayor proporción que las restantes.

En Arizona la incidencia de las cepas S fue inversamente correlacionada con la elevación (Bigelow *et al.*, 2000), lo cual es diferente a lo que observamos para las regiones analizadas en este estudio para nuestro país, Tartagal, Salta, se encuentra a una altura del nivel del mar de 502 mts, Las Lomitas, Formosa, a 130 mts y las localidades de la provincia de Córdoba de donde se obtuvieron muestras se encuentran comprendidas entre 200 – 400 mts sobre el nivel del mar (De Fina, 1992). Pero esta correlación descrita por estos autores parece cumplirse para el área de Corrientes donde la elevación es menor a 100mts y no se aislaron cepas S. Otra variable que ha sido relacionada con la incidencia de *A. flavus* es la latitud, Cotty (1997) a partir del estudio de las poblaciones de *A. flavus* en cultivos de algodón en Arizona, EEUU, sugirió que la incidencia está inversamente relacionada con esta variable. Los extremos de incidencia de cepas S, 31% en Salta y 0% en

Corrientes, se encuentran en diferentes latitudes, 22-23 y 27-28° LS respectivamente. Pero Córdoba se encuentra ubicada a una latitud aun mayor y en esta zona se aislaron cepas S. Este resultado indicaría que nuestras poblaciones de *A. flavus* no se verían, en principio, afectadas inversamente por la latitud, contrariamente a lo sugerido por Cotty (1997). Las incidencias altas de las cepas S han sido frecuentemente observadas para regiones con bajas precipitaciones y altas temperaturas, donde la producción de un alto número de pequeños esclerocios puede ser un rasgo de supervivencia de un organismo adaptado a fluctuaciones rápidas de humedad y temperatura (Horn & Dorner, 1999; Orum *et al.*, 1999; Carwell & Cotty, 2002). Esto concuerda con los resultados de este estudio ya que en la zona de Corrientes la humedad y las precipitaciones son mayores que para el resto de las zonas analizadas.

La temperatura media para las zonas de Corrientes, Formosa y Salta es similar, pero el clima y las precipitaciones son diferentes, siendo la zona de Corrientes la más húmeda (Tabla 1.2, Sección 1, pag. 44). Para la zona manisera de Córdoba la temperatura media es inferior con respecto a las otras zonas analizadas, y el promedio de precipitaciones es similar a los de Formosa y Salta (Tabla 1.2, Sección 1, pag. 44). Estas comparaciones permiten sugerir que el parámetro que podría definir las diferentes incidencias podría ser el de las precipitaciones, más que la temperatura aunque estas observaciones son muy preliminares y estudios de dinámica poblacional serían necesarios para contribuir a esta discusión. Muchas pueden ser las variables que influyen en la incidencia de *A. flavus* en las diferentes regiones agroecológicas, como se expresó en la discusión de la Sección 1. En Corrientes la variedad de maní es diferente al resto de las zonas, las prácticas agroecológicas son diferentes, así como también factores como suelo, luz, historia del suelo, rotación de cultivos, niveles de insectos, aplicación de funguicidas, irrigación, etc. Sin embargo, las fuerzas selectivas que favorecen el éxito de las diferentes cepas permanecen sin conocerse.

La relación observada entre la alta proporción de aislamientos productores de esclerocios y las hojas de plantas nativas y cultivadas de la zona de Corrientes muestran que las proporciones de aislamientos productores y no productores es similar entre las especies de *Arachis* analizadas, lo que indicaría que la composición de las poblaciones de *A. flavus* no se verían afectadas, en cuanto a la producción de esclerocios, por la especie de *Arachis*, el sitio de muestreo o el año. La formación de esclerocios puede verse influenciada

por factores climáticos como la luz y la temperatura, en muchas especies fúngicas la exposición a la luz induce la iniciación y el desarrollo de estas estructuras, mientras que cambios repentinos de temperatura pueden acelerar la producción e influir en la pigmentación de los mismos. Otros factores que pueden afectar la producción de esclerocios son los tejidos y extractos de los hospedantes, la cantidad y calidad de nutrientes tiene considerable influencia sobre la fase crecimiento predominante (Chet & Henis, 1975). En el presente estudio el sustrato analizado, hojas de distintas especies de *Arachis*, parecería no afectar la proporción de aislamientos productores de esclerocios. Por el contrario dentro de las plantas cultivadas, se observa una diferencia significativa entre la proporción de aislamientos productores de esclerocios y no productores provenientes de las hojas y las semillas. La proporción de aislamientos productores y no productores de esclerocios provenientes de las semillas es similar, mientras que para aquellos provenientes de las hojas la proporción de productores es significativamente mayor que la de no productores (Tabla 2.4).

Los aislamientos provenientes de las semillas de las zonas de Córdoba y Salta muestran la misma relación que los de las semillas de Corrientes (Figura 2.2) lo que sugeriría que las condiciones que se manifiestan en el suelo, donde se desarrollan las semillas de maní, afectan negativamente a la producción de esclerocios. Para *A. flavus*, en particular, se ha demostrado que la luz induce la formación de conidios y esclerocios, mientras que el ácido linoleico favorece la formación de conidios pero inhibe la producción de esclerocios (Bennet & Horowitz, 1979; Calvo *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2004). Estas observaciones, llevadas a las condiciones de este estudio para la zona de Corrientes, y sin tener en cuenta las variables temporal y geográfica ya que el muestreo para hojas y semillas de plantas cultivadas se realizó en el mismo momento y de los mismos sitios, permiten concluir que es predecible que el porcentaje de aislamientos productores de esclerocios provenientes de las semillas sea inferior al de las hojas, debido a que las condiciones de luz y temperatura en el ambiente aéreo serían las propicias para el desarrollo de esclerocios ya que hay más luz y la temperatura fluctúa mas rápidamente que en el suelo. Además las semillas de maní contienen ácido linoleico lo que afectaría negativamente a la producción de esclerocios. La identificación de los factores ambientales que pueden influir sobre la

diferenciación morfológica pueden ser útiles para el diseño de estrategias de control para la colonización de semillas por *Aspergillus*.

La importancia de determinar cepas productoras de esclerocios tipo S, L o no productoras puede explicarse debido a que estas estructuras de resistencia presentan germinación esporogénica con lo cual un eventual control de la infección pre-cosecha de *A. flavus* en los cultivos donde las aflatoxinas son un problema (ej. maní, algodón) requerirá prácticas agronómicas diseñadas a reducir la importancia de los esclerocios como fuente de inóculo primario (Wicklow, 1983). Los 3 tipos de cepas pueden diferenciarse fácilmente en cultivo, y la incidencia de cada una puede proveer una estimación rápida de la toxigenicidad de la población de *A. flavus* (Cotty, 1997). La toxigenicidad de la población de *A. flavus* en el campo puede ser un importante determinante del grado de producción de aflatoxinas dentro de cultivos. Al igual que para el sur de EEUU (Cotty, 1997), la toxigenicidad promedio de las poblaciones de *A. flavus* difiere significativamente a través de las áreas agroecológicas analizadas para la Argentina, como también dentro de cada una de ellas.

Los quimiotipos establecidos por Vaamonde *et al.* (2003) están representados en las áreas analizadas, con excepción del quimiotipo III (aflatoxinas pero no CPA) que no se observó en ninguno de los 278 aislamientos estudiados. El 79% produce aflatoxinas y el 98% CPA, siendo la producción de este último más uniforme que la de aflatoxinas, solo 6 cepas han sido registradas como no productoras de CPA, uno para Córdoba y cinco para Corrientes (Tabla 2.5), estos resultados son similares a los observados en otros estudios (Horn & Dorner, 1999; Geiser *et al.*, 2001). El hallazgo de cepas de *A. flavus* productoras de CPA en semillas de maní justifica el estudio de la ocurrencia natural de este metabolito (por si mismo) en maní cosechado en la Argentina. También sería de interés la investigación de otros tipos de alimentos derivados destinados a la alimentación animal para determinar la presencia y prevalencia de hongos productores de CPA y la contaminación natural con CPA de los mismos.

El 84% de los aislamientos de la zona manisera de Córdoba produce aflatoxinas, mientras que para Formosa, Salta y Corrientes los porcentajes son 85, 86 y 67% respectivamente (Fig. 2.6). Del total de cepas aflatoxigénicas, el 79% pertenece al quimiotipo I, lo cual concuerda con registros de otras partes del mundo para aislamientos

de *A. flavus* de suelo y diferentes cultivos como maíz y algodón (Setamou *et al.*, 1997; Cotty, 1997; Horn & Dorner, 1999; Barros *et al.*, 2003).

Las cepas productoras de AFB y AFG (21%) resultaron mas frecuentes en las provincias de Córdoba y Salta, este tipo ha sido registrado para países como Tailandia, Australia, Bénin y Argentina (Hesseltine *et al.*, 1970; Saito *et al.*, 1986; Blaney *et al.*, 1989; Cotty & Cardwell, 1999; Vaamonde *et al.*, 2003), nunca en Estados Unidos, Japón u otro país del Hemisferio Norte (Cotty & Cardwell, 1999; Horn & Dorner, 1999; Kumeda *et al.*, 2003). En Corrientes no se observaron aislamientos con este perfil de producción de aflatoxinas, lo que concuerda y demuestra la relación existente entre las cepas S y este patrón de producción de aflatoxinas.

*A. glabrata* fue en la única especie de *Arachis* donde no se aislaron cepas productoras de aflatoxinas, mientras que los aislamientos procedentes de *A. correntina* fueron es su mayoría productores de CPA, a diferencia del resto de las especies y zonas. Boyd y Cotty (2001) observaron que en pericarpios de legumbres de *Prosopis* spp, la incidencia de aislamientos aflatoxigénicos fue significativamente mayor en otras leguminosas del mismo sitio, indicando que esto puede ser consecuencia de una composición inadecuada de nutrientes o la presencia de algún compuesto inhibitorio para la biosíntesis de aflatoxinas. Serían necesarios mas aislamientos para verificar si esta tendencia continua y si efectivamente estas especies de maní producen algún metabolito de selección que favorezca a las cepas atoxigénicas de *A. flavus*. Por el contrario, los aislamientos provenientes de las hojas de *A. burckartii* y *A. hipogaea* resultaron todos aflatoxigénicos. Teniendo en cuenta esta diferencia entre especies, este estudio sugeriría que la variable temporal en este caso no afectaría a las poblaciones en cuanto a sus características toxigénicas. Orum *et al.* (1997) en un estudio de dos años de poblaciones de *A. flavus* de diferentes campos observaron que para algunos la variable temporal fue un factor que influía significativamente a la composición de la población mientras que para otros la variable más influyente resultó ser el suelo o condiciones climáticas más que la rotación de cultivos. En Corrientes, estudios que se están llevando a cabo en la actualidad muestran que las cepas S no son aisladas en esta zona (Pereira *com. pers.*), sin importar el año.

Al comparar maní nativo y cultivado como sustratos para *A. flavus* puede observarse que los aislamientos procedentes de hojas de plantas nativas resultaron ser en un 69.7% de los casos productores de CPA solamente, este porcentaje se encuentra altamente influenciado por los aislamientos de *A. glabrata* (sitio 12), sustrato a partir del cual se obtuvieron más aislamientos de *A. flavus*. Pero aquellos aislamientos obtenidos a partir de hojas de plantas fueron en un 100% capaces de producir aflatoxinas. Así mismo, aquellos aislamientos obtenidos de semillas de plantas cultivadas presentaron un perfil de producción mas variado que el de aislamientos provenientes de hojas (Fig. 2.8); el 61.5% fueron productores de AFB, el 23.1 % no produjo aflatoxinas ni CPA y el 5.4 % restante solo produjo CPA. Estas diferencias entre aislamientos provenientes de diferentes especies de maní como también de diferentes órganos sugeriría que la capacidad toxigénica se ve influenciada por el sustrato, y que las poblaciones de *A. flavus* asociadas a las semillas son diferentes a las de la parte aérea y que a su vez difieren entre las especies de *Arachis*.

La función de las aflatoxinas y su rol adaptativo está aún siendo debatido (Demain & Fang, 2000) con lo cual la observación de aislamientos de *A. flavus* aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos igualmente capaces de infectar cultivos susceptibles sigue sin poder ser explicada (Cotty, 1989). Ehrlich *et al.* (2005) estimaron que la producción de aflatoxinas en *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* se ha mantenido por lo menos durante 100 millones de años sugiriendo por lo tanto que tendrían algún valor adaptativo. Bilgrami *et al.* (1988) postularon que la producción de aflatoxinas se mantiene en la naturaleza por competencia con otros microorganismos y por exposición a condiciones de crecimiento sub-óptimas (alta temperatura, pH bajo y pocos nutrientes). Si extrapolamos estas observaciones para este estudio, indicarían que las condiciones de la parte aérea de las plantas seleccionarían a aquellos aislamientos productores de aflatoxinas debido a que la temperatura es mas alta que en el suelo, y los nutrientes que estarían disponibles sobre la superficie de las hojas serían diferentes o estarían en menor proporción que en la semilla, la cual ha sido registrada como sustrato natural de *A. flavus* (Hill *et al.*, 1983; Diener *et al.*, 1987; Kokalis-Burrelle *et al.*, 1997). El estrés hídrico acompañado por temperaturas elevadas durante el desarrollo de la semilla promueve la invasión por *A. flavus* y subsiguiente contaminación de las semillas con aflatoxinas (Hill, *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1980; Klich, *et al.*, 1984). Como este estudio es el primer registro sobre aislamientos obtenidos de hojas cultivadas y de plantas nativas serían necesarios más aportes de este tipo con análisis fisiológicos comparando disponibilidad de nutrientes entre las especies de *Arachis*, entre hojas y semillas, relación con factores climáticos, suelo, etc.

La asociación positiva entre la producción de esclerocios y aflatoxinas que observamos en este estudio coincide con otros autores que postulan que las aflatoxinas tienen una función correlacionada con los esclerocios y que la biosíntesis de aflatoxinas y morfogénesis de los esclerocios están interrelacionadas (Wicklow & Shotwell, 1983; Trail *et al.*, 1995a; Chang *et al.*, 2001; Calvo *et al.*, 2004). Esta asociación es confirmada por los estudios de compatibilidad vegetativa, en los cuales los aislamientos que conforman un grupo de compatibilidad determinado comparten el mismo fenotipo en cuanto a la producción de esclerocios y aflatoxinas (Bayman & Cotty, 1993; Horn *et al.*, 1999; Pildain *et al.*, 2004). El incremento de la producción de toxinas coincide con el decrecimiento en el tamaño de los esclerocios, se sugiere que esta alteración puede ser causada por competencia por un sustrato común como el acetato (Calvo *et al.*, 2004).

En la Argentina la incidencia de cepas S productoras de AFB y AFG varía desde 7.5 hasta un 30%, todas aisladas a partir de semillas de maní o suelo de campos donde se cultiva maní (Vaamonde *et al.*, 1995; Pildain *et al.*, 2004; Barros *et al.*, 2005). En aislamientos realizados a partir de maíz no se observó la presencia de este tipo de cepas (Nesci & Etcheverry, 2002). En Estados Unidos sólo han sido registradas cepas S productoras de AFB (Horn & Dorner, 1999; Carwell & Cotty 2002), sin embargo en Nigeria, Tailandia, Australia y Benin, las cepas S registradas presentan un patrón de producción de aflatoxinas que incluye las de tipo B y G (Hesseltine *et al.*, 1970; Saito *et al.*, 1986; Blaney *et al.*, 1989; Cotty & Cardwell, 1999). Todas estas cepas “atípicas” han sido aisladas en países del hemisferio Sur o por debajo del Trópico de Cáncer, los resultados obtenidos en este estudio permiten establecer que para el continente Americano, éstas están presentes al menos entre 22° y 34° de latitud Sur.

Las cepas S productoras de AFB o AFB y AFG han sido denominadas como *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* Saito y Tsuruta (Saito & Tsuruta, 1993) y establecidos como especie *A. parvisclerotigenus* (Saito y Tsuruta) Frisvad y Samson (Frisvad *et al.*, 2005), ambos basados en un tipo no productor de aflatoxinas tipo G. Estudios moleculares realizados con cepas de *A. flavus* de diversa procedencia geográfica (Geiser, *et al.*, 1998; Tran-Dinh *et al.*, 1999; Geiser, *et al.*, 2001) indican que las cepas S productoras de aflatoxinas de tipo B y G y CPA forman un subgrupo que debe ser reconocido como una nueva especie. Las características particulares de producción de esclerocios y perfil



toxigénico establecido para los aislamientos incluidos en el presente estudio permiten sugerir que *A. parvisclerotigenus* se encuentra presente en la Argentina, aunque es necesario comparar características genéticas, morfológicas y bioquímicas entre nuestros aislamientos y el tipo de la especie para arribar a una conclusión.

Los resultados de este estudio aportan nuevos datos sobre las poblaciones de *A. flavus* de la Argentina, asociando caracteres morfológicos y toxigénicos de las cepas aisladas con las posibles diferencias agroecológicas de las diferentes áreas geográficas de las cuales provienen los aislamientos. Se han tenido en cuenta características de las cepas que están estrechamente relacionadas con la contaminación potencial del maní con las toxinas producidas por esta especie fúngica asociada, tales como la capacidad toxigénica y la producción de estructuras de resistencia señaladas como importante fuente de inóculo primario. Además se analizó el potencial toxigénico de aislamientos provenientes plantas nativas silvestres, donde la contaminación con aflatoxinas permanece inexplorada, pudiendo resultar un importante reservorio de hongos aflatoxigénicos.

## CONCLUSIONES PARCIALES

- *flavus* productores de esclerocios tipo L son los más frecuentemente aislados a partir de plantas nativas y cultivadas de maní en la Argentina.
- La incidencia de las cepas S estaría relacionada con climas secos con elevadas temperaturas. La humedad relativa alta y las precipitaciones no favorecen el establecimiento de este tipo de cepas.
- La formación de esclerocios no estaría afectada por la especie de *Arachis* a partir de la cual se aísla, pero sí del órgano y los factores climáticos como la luz y fluctuaciones rápidas de temperatura que favorecen el desarrollo de los mismos. La oscuridad no favorecería la formación de esclerocios, por lo cual en las semillas de maní, las poblaciones de *A. flavus* tienen mayor frecuencia

de cepas no productoras de esclerocios que aquellas semillas y órganos que se desarrollen en el espacio aéreo.

- Las poblaciones de *A. flavus* de nuestra zona manisera son altamente toxigénicas. El quimiotipo más frecuente es el I, aunque también se encuentran el II y el IV.
- La importantísima frecuencia de productores de CPA justifica el estudio de la ocurrencia natural de este metabolito.
- Las poblaciones aflatoxigénicas de *A. flavus* se ven influenciadas por el sustrato, como una posible consecuencia de una composición inadecuada de nutrientes o la presencia de algún compuesto inhibitorio para la biosíntesis de aflatoxinas.
- Las aflatoxinas tendrían un rol adaptativo relacionado con la competencia con otros organismos y exposición a condiciones de crecimiento inadecuadas.
- La producción de esclerocios y aflatoxinas está positivamente relacionada. Todos los aislamientos tipo S producen AFB y AFG y viceversa, este tipo de cepas deberían considerarse como una nueva especie.



## INTRODUCCIÓN DE LA SECCION

### Técnica de análisis de compatibilidad vegetativa (VC)

En *Aspergillus*, la determinación de la reacción de compatibilidad, que da como resultado un heterocarionte estable, es de difícil detección visual por lo que se utilizan mutantes deficientes en la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno (*nit-*) enfrentados en cajas de Petri. 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).

El mecanismo de acción del clorato es todavía incierto y puede diferir de organismo en organismo. Se ha propuesto que el clorato es transformado por la nitrato reductasa en clorito, el cual es un compuesto tóxico para la célula (Aberg, 1947 en Cove, 1976a). Sin embargo, a través de estudios llevados a cabo en *A. nidulans* se determinó que la actividad catalítica de la nitrato reductasa no estaría involucrada en este proceso y que 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. Cove (1976a), Correll *et al.* (1987) y Bayman y Cotty (1991a) proponen que las células capaces de reducir nitrato a nitrito generalmente reducen clorato a clorito, el cual es tóxico y las envenena. Mientras que 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 y Leslie (1988) en un estudio sobre *Fusarium moniliforme* (Sheld.) emend. Snyder & 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) (Tabla 3.1).

Los tres tipos de mutantes crecen con características morfológicas de tipo salvaje en presencia de amonio: micelio aéreo profuso, de crecimiento rápido, color característico de la especie y producción de conidios. En presencia de nitrato 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 nitrato 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.

**Tabla 3.1:** Tipos de mutantes *nit*-, funciones y caracterización\*.

Locus	Función	Crecimiento <sup>a</sup>			
		NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	HPX
<i>niaD</i>	Gen estructural de la niR <sup>b</sup>	+	-	+	+
<i>nirA</i>	Gen de la vía reguladora de la síntesis de niR <sup>b</sup> y noR <sup>c</sup>	+	-	-	+
<b><i>cnxABC</i></b>					
<i>cnxE</i>	Genes que controlan la producción de un cofactor que contiene Mo <sup>d</sup>	+	-	+	-
<i>cnxF</i>					
<i>cnxG</i>					
<i>cnxH</i>					

\*Modificado de Klittich y Leslie (1988); Novas (2000).

<sup>a</sup>En todos los casos el medio de cultivo es Czapek-Dox con distintas fuentes de nitrógeno. NH<sub>4</sub>: amonio; NO<sub>3</sub>: nitrato; NO<sub>2</sub>: nitrito; HPX: hipoxantina

<sup>b</sup>niR: nitrato reductasa

<sup>c</sup>noR: nitrito reductasa

<sup>d</sup>Mo: molibdeno

## OBJETIVOS PARTICULARES

Utilizar la técnica de compatibilidad vegetativa (VC) para:

- Registrar mediante la identificación de VCG la variabilidad genética de las cepas aisladas de muestras de maní de las zonas de Corrientes, Formosa y Salta y

comparar los VCGs que se obtengan con los de Córdoba, ya establecidos por Novas y Cabral (2002).

- Registrar mediante la identificación de VCGs la variabilidad genética de las cepas con características atípicas (esclerocios pequeños y/o productoras de aflatoxinas B y G y CPA provenientes de Argentina, Australia, Africa y Estados Unidos).
- Comprobar si existe correlación entre VCGs y el patrón de micotoxinas producidas en *A. flavus* (particularmente entre las que presentan un patrón atípico).
- Comprobar si existe correlación entre VCGs y características morfológicas de las cepas de *A. flavus* en estudio.
- 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

- La estructura poblacional de *A. flavus* de cada una de las regiones agroecológicas depende de características climáticas, agro culturales y factores físicos como la altura y la latitud.
- Los miembros de un VCG comparten el mismo patrón de producción de esclerocios y aflatoxinas.
- Las cepas atípicas de *A. flavus* de la Argentina no son vegetativamente compatibles con aquellas provenientes de Benin, EEUU y Australia.
- Las cepas atípicas de *A. flavus* presentan una variabilidad genética propia y no conforman VCGs con las cepas típicas.
- Los aislamientos de *A. flavus* de la Argentina son muy variables con respecto a la compatibilidad vegetativa, el número de VCGs interregionales es bajo.

## MATERIALES Y METODOS

Para la obtención de mutantes *nit*, estudios de autocompatibilidad y establecimientos de VCGs se utilizaron cepas de *A. flavus* aisladas de muestras de maní de las zonas de Formosa ( $n= 40$ ), Salta ( $n= 118$ ) y Corrientes ( $n= 90$ ). Una vez caracterizada la estructura poblacional de cada una de estas áreas se realizaron estudios de VC incorporando las 25 cepas de la zona manisera de Córdoba utilizadas por Novas y Cabral (2002) quienes establecieron 14 VCGs (Tabla 3.2).

Las cepas de *A. flavus* atípicas (esclerocios S y productoras de AFB, AFG y CPA) aislados de las distintas regiones agroecológicas de la Argentina caracterizadas por VC se compararon con otras cepas atípicas provenientes de Australia, África y Estados Unidos (Tabla 3.3).

### 1. Aislamiento de posibles mutantes *nit*

Para este paso y todos los posteriores, salvo excepciones que se explican en el texto, utilizamos cajas descartables de 6 cm de diámetro.

Para la obtención de mutantes *nit* se utilizaron 2 técnicas:

A) Se siguió la metodología propuesta por Bayman y Cotty (1991a). De cada aislamiento se inocularon conidioforos de *A. flavus*, a partir de cultivos en tubos pico de flauta, en cajas de Petri de 6 cm de diámetro con medio de cultivo Cz-Dox al que se añadió 25g/L de clorato de potasio. Los cultivos se incubaron a 30°C en oscuridad durante 7 – 10 días.

La morfología de los sectores mutantes consiste en micelio escaso conformado por hifas muy ramificadas con relativamente pocos conidios. Los márgenes de la colonia aparecen irregulares y festoneados con sectores de crecimiento rápido. Esta morfología es típica de crecimiento en medio con poco nitrógeno (Cove, 1976a). En contraste, el crecimiento tipo salvaje en Cz-Dox es mucho más conspicuo, con micelio profuso, alta producción de conidios y márgenes de colonia mucho más uniformes.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron bajo lupa las zonas de crecimiento rápido y con una aguja fina se tomó la menor cantidad 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 crecimiento de un micelio ocultando otro. Por ejemplo que un mutante del tipo *niaD* ocultara la presencia de un *nirA* o un *cnx*.

Los sectores auxotrópicos se transfirieron a cajas de Petri conteniendo Cz-Dox. Luego de una incubación de 7 días, las colonias con fenotipo mutante se transfirieron a cajas de Petri conteniendo Cz-Dox para su caracterización y a cajas conteniendo Cz-Dox con tartrato de amonio en una concentración de 0.9 g/L para asegurarnos un buen desarrollo de micelio y de que el posible mutante obtenido sea un mutante *nit*, debido a que el cultivo se realizó en un medio rico en amonio donde el nitrógeno se encuentra disponible para cualquier tipo de mutante *nit*.

Las cajas se incubaron a 30°C y oscuridad hasta observar desarrollo de micelio. Posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

**B)** Se siguió la metodología propuesta por Bayman y Cotty (1991a) con las modificaciones de Cotty (1994). La metodología es la misma salvo por: el medio de cultivo utilizado para la obtención de mutantes *nit* es Cz-Dox al que se añadió 25g/L de Clorato de potasio y 50 mg/L de rosa de bengala, con pH no ajustado. Este medio fue formulado para obtener mayor proporción de los distintos mutantes.

La otra modificación efectuada es que luego de la selección bajo lupa de las zonas de crecimiento rápido que se generaron en el primer paso, éstas son transferidas a cajas de Petri conteniendo Cz-Dox con 15g/L de Clorato de potasio para estabilizar los posibles mutantes que se obtuvieran.

## **2. Clasificación de los mutantes *nit***

A partir de colonias desarrolladas en cajas conteniendo amonio como fuente de nitrógeno, se transfirieron pequeños fragmentos de micelio a cajas con medio Cz-Dox que contenían diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato (NO<sub>3</sub>), nitrito (NO<sub>2</sub>) e hipoxantina. El nitrato y el nitrito se añadieron como sales de sodio en una concentración 0.3g/l y 0.7g/L respectivamente y la hipoxantina en 0.1g/L (Papa, 1986).

Para esta instancia se utilizaron cajas de Petri de 14cm de diámetro divididas en 16 sectores cada una de manera de poder caracterizar 16 posibles mutantes por caja.



Las cajas se incubaron por 7 días a 30°C en oscuridad. Luego de este periodo se clasificaron los mutantes como *nirA*, *niaD* y *cnx* según su capacidad de crecer en los distintos medios analizados (Tabla 3.1). Los mutantes *nit* obtenidos se conservaron en heladera a 4°C en cajas de Petri con medio de cultivo Cz-Dox hasta su utilización.

### **3. Reconocimiento de los heterocariontes**

#### **3.1 Estudio de autocompatibilidad**

Se realizan apareamientos entre las diferentes clases de mutantes de la misma cepa para establecer si existe autocompatibilidad. Pares de mutantes (*nirA* x *niaD*/ *cnx*) se siembran en placas con Cz-Dox a 2cm de distancia entre sí y se incuban a 30°C durante 21 días. La compatibilidad o complementación se visualiza como una zona de crecimiento denso, tipo salvaje, generalmente acompañado de la formación de esclerocios en la zona de contacto (Fig. 3.1). Una vez que se seleccionaron los mutantes autocompatibles (1 par /cepa), se cultivaron en Cz-Dox y se tomaron cinco *plugs* con sacabocado estéril de cada una de las colonias y fueron colocados en eppendorfs de 2ml conteniendo 1 ml de agua destilada estéril. Los eppendorfs rotulados con el tipo de mutante, nombre de cepa y fecha de cultivo fueron almacenados en heladera a 4°C para su conservación, de esta manera se trató de mantener la estabilidad genética de los mutantes obtenidos (Smith y Onions, 1994).

#### **3.2 Estudio de compatibilidad vegetativa entre las distintas cepas**

Las confrontaciones para el establecimiento de VCGs se realizaron en todas las combinaciones posibles mediante el procedimiento mencionado en el punto anterior. Cada uno de los pares de mutantes autocompatibles de cada cepa se confrontó con el complementario de otra cepa (ej.: *nirA* de cepa A con *nia D* de cepa B, y *niaD* de cepa A con *nirA* de cepa B). Cada uno de los mutantes se colocaron en 4 puntos separados entre si por una distancia de 1.5cm (Fig. 3.1). Los aislamientos que complementaron en los enfrentamientos fueron asignados al mismo VCG. Cuando se generaba un nuevo par de aislamientos complementarios, estos eran enfrentados con todos los miembros de VCGs previamente establecidos.

Al confrontar los pares de mutantes obtuvimos los resultados por duplicado. Todas las reacciones positivas y las que resultaron confusas fueron repetidas para verificación, en estos casos realizamos triplicados y cuadruplicados.

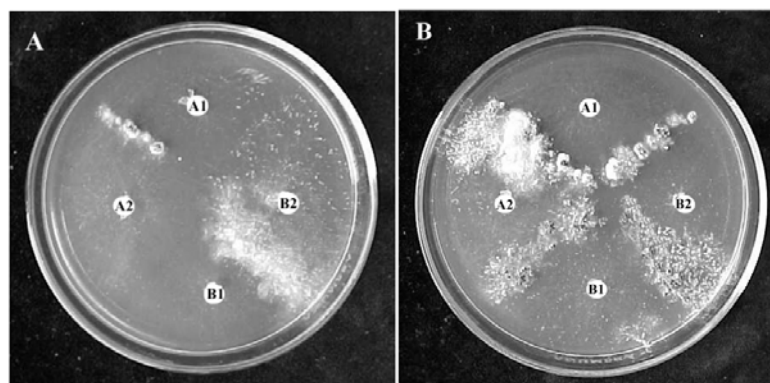
#### 4. Establecimiento de los VCGs

En función de los resultados obtenidos se establecieron los grupos de cepas pertenecientes a diferentes VCGs.

Se analizaron los VCGs para cada zona agroecológica por separado y luego se realizaron las confrontaciones entre los mutantes autocompatibles de todas las zonas estudiadas (Córdoba, Formosa, Salta y Corrientes). Además se obtuvo el índice de diversidad genética, definido como el cociente entre el número de VCGs dividido el número de cepas autocompatibles totales (Horn y Greene, 1995) para cada zona y para toda el área manisera analizada en este estudio para nuestro país. Además se comparó utilizando VC a las cepas atípicas de *A. flavus* aisladas en la Argentina con otras provenientes de Australia, Benin y Estados Unidos.

Previamente al enfrentamiento entre cepas de las diferentes regiones se comprobó que los mutantes autocompatibles de cada región siguieran siendo autocompatibles. Este paso se repitió para cada una de las cepas las veces que fuera necesario.

**Figura 3.1.** Enfrentamiento de mutantes *nit* de *A. flavus* en para determinación de grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs).



Las placas fueron fotografiadas luego de 15 días de incubación. Las líneas de crecimiento miceliano robusto entre mutantes *nit* indican reacciones compatibles. En **A**, mutantes autocompatibles del aislamiento LLF9 (A1= *cnx*; A2= *niaD*) y LLF40 (B1= *cnx*; B2= *niaD*), pertenecen a diferentes VCGs. **B**, formación del heterocarionte entre aislamientos autocompatibles LLF9 (A1= *cnx*; A2= *niaD*) y LLF8 (B1= *cnx*; B2= *niaD*), pertenecientes al mismo VCG.

## 5. Análisis estadístico

El porcentaje de los mutantes *niaD*, *nirA* y *cnx* fue estadísticamente analizado usando un diseño de ANOVA de un factor, seguido de la prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias ( $P= 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistix for Windows, version 2.1 Analytical Software.

**Tabla 3.2.** Grupos de compatibilidad vegetativa, producción de esclerocios y quimiotipos de *A. flavus* de la zona manisera de Córdoba (Novas y Cabral, 2002).

<i>Cepa</i> <sup>a</sup>	<i>Esclerocios</i>	<i>Quimioti</i>	<i>VCG</i>	<i>Aislamiento/ VCG</i>
M35N1A	-	IV	A	
M34N2	-	V	A	
M15N3	-	I	A	5
M11N1	-	IV	A	
M11N1X	-	IV	A	
M12N1	L	I	B	
M6N1	L	I	B	
M32N1	L	I	B	5
M38N1	L	I	B	
M29N1	L	I	B	
M32N4	S	II	C	
M38N3	S	II	C	3
M35N2	S	II	C	
M36N1	L	I	D	
M3N1X	L	I	D	2
M22N3	S	II	E	
M36N2	S	II	E	2
M2N1	L	I	F	1
M10A	L	I	G	1
M10N3	L	I	H	1
M11N3	L	I	I	1
M14N1	-	I	J	1
M14N2	-	I	K	1
M29N3	-	I	L	1
M40N1	S	II	M	1

<sup>a</sup> Siglas adjudicadas para los aislamientos de *A. flavus* de la zona de Córdoba.

**Tabla 3.3.** Cepas de *A. flavus* atípicas provenientes de Australia, Benin y Estados Unidos.

<i>Cepa</i>	<i>Quimiotipo</i> <sup>a</sup>	<i>Origen</i>
A3 <sup>a</sup>	II	Kingaroy, Australia
A13 <sup>a</sup>	II	Kingaroy, Australia
A19 <sup>a</sup>	IV	Colston Lake, Australia
A31 <sup>a</sup>	IV	Colston Lake, Australia
Bn08 <sup>b</sup>	II	Colston Lake, Australia
Bn26 <sup>b</sup>	II	Benin, West Africa
Bn38 <sup>b</sup>	II	Benin, West Africa
Bn40 <sup>b</sup>	II	Benin, West Africa
La25 <sup>b</sup>	I	Yuma Valey, Arizona USA
Ms22 <sup>b</sup>	I	Yuma Valey, Arizona USA
70ss2 <sup>b</sup>	I	Yuma Valey, Arizona USA
12ss1 <sup>b</sup>	I	Yuma Valey, Arizona USA

<sup>a</sup>Cepas cedidas por el Dr. J. Pitt, SIRO Division of Food Science and Tecnology, North Ryde Australia.

<sup>b</sup>Cepas cedidas por el Dr. P. Cotty, Department of Plant Sciences, University of Arizona, EEUU.

## RESULTADOS

### 1. Obtención de Mutantes

#### 1.1 Aislamiento de los posibles mutantes

El desarrollo del micelio de *A. flavus* en el medio selectivo es lento, sumergido y hialino. A partir de 7 días de incubación en estufa a 30°C, se observaron sectores de crecimiento rápido en los bordes de crecimiento de la colonia, aunque en algunas cepas el tiempo necesario para que la sectorización fuera visible fue de 10 a 15 días. Estos sectores consisten en micelio sumergido formado por hifas separadas entre si, con muy bajo grado de esporulación. Estas características indican el posible desarrollo de un mutante *nit*.

Se efectuó la comparación entre las dos técnicas descritas para aislamiento de posibles mutantes con las 40 cepas de *A. flavus* de Formosa. De cada una de las cajas de Petri donde se observó sectorización, se tomaron 4 sectores cuyo fenotipo parecía mutante y se siguió el protocolo correspondiente, al final se contabilizó el número de cepas que sectorizaron y los mutantes obtenidos. La experiencia se realizó por duplicado. Con la primera técnica (Cove, 1976; Bayman y Cotty, 1991a) sectorizaron 17 cepas en el primer ensayo y 15 en el duplicado, lo que da un porcentaje promedio del 40%, obteniéndose 30 y 28 mutantes respectivamente con una efectividad del 60.5% en promedio. Para la segunda

técnica (Cotty, 1994) sectorizaron 23 y 24 cepas dando un porcentaje promedio de 59%, obteniéndose 70 y 68 mutantes respectivamente con un porcentaje promedio de efectividad del 74%. En vista de esta diferencia se utilizó para todas las cepas de *A. flavus* de todas las zonas la técnica modificada por Cotty (1994) con rosa de bengala y un pasaje por clorato 15%.

La mayoría de las colonias de *A. flavus* sectorizan a los 7 días, aunque algunos aislamientos no pudieron analizarse debido a que nunca se obtuvo sectorización y fueron excluidos del análisis poblacional.

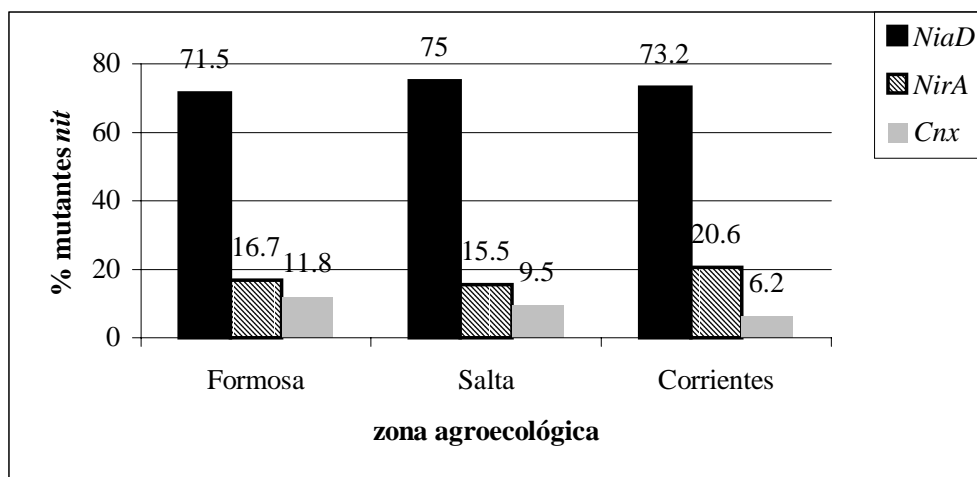
## 1.2 Clasificación de los mutantes

De las 248 cepas utilizadas (Formosa, Salta y Corrientes), en 12 no se observó sectorización y en 72 no se obtuvieron al menos dos tipos de mutantes con los medios utilizados, en la mayoría de los casos el mutante que se obtuvo fue *niaD*. Para 42 cepas se obtuvieron al menos dos tipos de mutantes pero no resultaron compatibles.

De todas las cepas donde se logró que desarrollara algún tipo de mutante, los *niaD* fueron los más frecuentes ( $n= 1295$ ) mientras que 307 fueron clasificados como *nirA* y 151 como *cnx*. Los mutantes *cnx* resultaron ser muy buenos testigos en las confrontaciones debido a su bajo grado de esporulación y a la formación de heterocariones 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 resultó muy difícil, se usaron los mutantes con los que se contaba.

El patrón de frecuencias de los mutantes obtenidos se repitió para cada una de las zonas analizadas (Fig. 3.2). El porcentaje total de mutantes *niaD* fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que el de *nirA* y *cnx*, mientras que el porcentaje de *nirA* con respecto al de *cnx* también fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) (anexo pag.V). La frecuencia de los tres tipos de mutantes en todas las zonas puede resumirse como: *niaD* > *nirA* > *cnx*, aunque para Formosa y Salta no hubo diferencias significativas entre las frecuencias de mutantes *nirA* y *cnx* (anexo pag.V).

**Figura 3.2.** Porcentajes de mutantes *niaD*, *nirA* y *cnx* de aislamientos de *A. flavus* de las zonas agroecológicas de Formosa, Salta y Corrientes.



## 2. Estudio de autocompatibilidad

La formación del heterocarionte se observa como una franja de crecimiento 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 (Fig. 3.1). La incompatibilidad, por el contrario, se visualiza como una zona de contacto sin crecimiento de micelio (Fig. 3.1).

Para la gran mayoría de los aislamientos se obtuvieron 3-4 mutantes *nit* autocompatibles, aunque hubo casos en los que se obtuvieron siete o más. La combinación más frecuente fue *niaD-nirA*. Cuando se disponía de más de un par de mutantes autocompatibles se seleccionó aquella combinación donde los mutantes produjeran menor número de conidios y la formación del heterocarionte fuera rápida y clara.

En algunos de los casos, cuando se repitió 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.

Para el área agroecológica de Formosa se obtuvieron mutantes autocompatibles para 25 de los 40 aislamientos, mientras que para Salta 51 de 118 y para Corrientes de las plantas cultivadas 29 de 57 y para las nativas 17 de 33.

Para cada zona agroecológica se trató de obtener el mayor número de mutantes autocompatibles posibles, para representar la variabilidad genética de la zona, teniendo en

cuenta el número de aislamientos del que se partió. Pero debido a que la técnica es muy laboriosa, para el lapso de tiempo de esta tesis no se alcanzó a obtener los mutantes autocompatibles para todas las cepas de estudio.

### **3. Estudio de VC entre las distintas cepas**

#### **3.1 Formosa**

De los 40 aislamientos analizados para la zona de Formosa, se obtuvieron mutantes *nit* de 38 de ellos, los otros 2 no produjeron sectores *nit* y fueron retirados del análisis. De estos 38 aislamientos, 7 sólo produjeron un solo tipo de mutante y 6 produjeron más de un tipo pero no fueron autocompatibles. Los resultados de las confrontaciones entre los 25 aislamientos autocompatibles de *A. flavus* obtenidos para la zona de Formosa se muestran en la Tabla 3.4.

Las 25 cepas de *A. flavus* analizadas para esta zona se distribuyeron en 16 VCGs. 11 cepas no mostraron ser compatibles con ninguna otra cepa (VCGs S a C1) y 14 se agruparon con 1 o más cepas. Los VCGs mas frecuentes fueron el VCGN y el VCGO con 4 aislamientos cada uno y el índice de diversidad genética para Formosa resultó ser igual a 0.64 (Tabla 3.4).

Todas las cepas integrantes de un mismo VCG pertenecen al mismo quimiotipo y además todas comparten la capacidad o no de producir esclerocios. Al igual que para Córdoba, no se observó ningún VCG que incluyera cepas S y L. Los VCGs R y C1 quedaron conformados por cepas atípicas (productoras de esclerocios S, AFB, AFG y CPA).

**Tabla 3.4.** Resultados de las confrontaciones entre las cepas autocompatibles de *A. flavus* de Formosa.

<i>Cepa</i> <sup>a</sup>	<i>Esclerocios</i> <sup>b</sup>	<i>Quimioti</i>	<i>VCG</i> <sup>d</sup>	<i>Aislamiento/ VCG</i>
LLF8	L	I	N	
LLF9	L	I	N	4
LLF25	L	I	N	
LLF36	L	I	N	
LLF3	ND	I	O	
LLF17	ND	I	O	4
LLF22	ND	I	O	
LLF35	ND	I	O	
LLF14	L	I	P	2
LLF40	L	I	P	
LLF5	ND	IV	Q	2
LLF30	ND	IV	Q	
LLF37	S	II	R	2
M5N9	S	II	R	
2LLF1	ND	IV	S	1
LLF7	L	IV	T	1
LLF10	L	I	U	1
LLF13	L	IV	V	1
LLF15	ND	I	W	1
LLF21	L	I	X	1
LLF16	L	I	Y	1
LLF18	L	IV	Z	1
LLF33	ND	IV	A1	1
LLF34	L	I	B1	1
LLF39	S	II	C1	1

<sup>a</sup> Siglas adjudicadas para los aislamientos de *A. flavus* de la zona de Formosa.

<sup>b</sup> L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

<sup>c</sup> Quimiotipo I: AFB y CPA; II: AFB, AFG y CPA; IV: CPA (Vaamonde *et al.*, 2003).

<sup>d</sup> Designación de los VCGs correlativa con la de Novas y Cabral (2002).

### 3.2 Salta

Se obtuvieron mutantes autocompatibles para 50 cepas de *A. flavus* de Salta. Mientras que 43 cepas sólo produjeron un solo tipo de mutante, 6 produjeron más de un tipo pero no fueron autocompatibles y 9 cepas no sectorizaron en clorato. Los resultados de las confrontaciones entre los 50 aislamientos autocompatibles de *A. flavus* obtenidos para esta zona, se muestran en la Tabla 3.5.

Las cepas donde se obtuvieron mutantes autocompatibles se distribuyeron en 40 VCGs, siete de los cuales presenta más de un aislamiento y los restantes están compuestos sólo por una cepa (Tabla 3.5). Los VCGs D1, E1 y F1 incluyen el mayor número de aislamientos, tres cada uno, y todos están conformados por cepas atípicas de *A. flavus*. Los



VCGs G1, H1, I1 y J1 están compuestos por dos aislamientos cada uno y los VCGs K1 a Q2 sólo por un aislamiento. El índice de diversidad genética para Salta es igual a 0.8.

Al igual que para los VCGs de Formosa, todas las cepas que integran un mismo grupo comparten el mismo quimiotipo, mientras que para la capacidad o no de producir esclerocios resultó diferente para los aislamientos de los VCGs H1 e I1, donde puede observarse aislamientos productores y no productores. Además al igual que para Córdoba y Formosa, no se encontró ningún VCG que incluyera cepas S y L.

Las cepas que conformaron el VCG G1 (T2N4 y T3N21) (Tabla 3.5) fueron luego re-evaluadas en la Sección 4 de esta tesis y clasificadas como *A. tamarii*.

**Tabla 3.5.** VCGs conformados por los aislamientos de *A. flavus* de la zona de Salta.

<i>Cepa</i> <sup>a</sup>	<i>Esclerocios</i> <sup>b</sup>	<i>o</i> <sup>c</sup>	<i>Quimiotip</i>	<i>VCG</i> <sup>d</sup>	<i>Aislamiento/ VCG</i>
T1N20	S		II	D1	
T1N31	S		II	D1	3
T1N33	S		II	D1	
T1N21	S		II	E1	
T1N35	S		II	E1	3
T3N44	S		II	E1	
T4N18	S		II	F1	
T4N32	S		II	F1	3
T4N35	S		II	F1	
T2N4*	ND		IV	G1	
T3N21*	ND		IV	G1	2
T1N7	ND		I	H1	
T3N9	L		I	H1	2
T3N24	L		IV	I1	
T3N27	ND		IV	I1	2
T4N33	S		II	J1	
T4N50	S		II	J1	2
T1N13	ND		I	K1	1
T1N15	L		I	L1	1
T1N17	ND		IV	M1	1
T1N34	S		II	N1	1
T3N4	L		I	O1	1
T3N6	ND		IV	P1	1
T3N8	L		I	Q1	1
T3N11	L		I	R1	1
T3N15	L		I	S1	1
T3N20	ND		I	T1	1
T3N23	L		I	U1	1
T3N25	ND		I	V1	1
T3N26	ND		I	W1	1
T3N28	L		I	X1	1
T3N33	ND		IV	Y1	1
T3N34	S		II	Z1	1
T3N53	L		I	A2	1
T4N1	L		I	B2	1
T4N2	L		I	C2	1
T4N4	ND		I	D2	1
T4N5	L		I	E2	1
T4N6	L		I	F2	1
T4N7	L		I	G2	1
T4N13	L		I	H2	1
T4N14	L		IV	I2	1
T4N16	S		II	J2	1
T4N25	ND		I	K2	1
T4N29	ND		I	L2	1
T4N34	S		II	M2	1
T4N39	L		I	N2	1
T4N47	L		I	O2	1
T4N49	ND		I	P2	1
T4N52	L		I	Q2	1

<sup>a</sup> Siglas adjudicadas para los aislamientos de *A. flavus* de la zona de Salta.

<sup>b</sup>L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

<sup>c</sup> Quimiotipo I: AFB y CPA; II: AFB, AFG y CPA; IV: CPA (Vaamonde *et al.*, 2003).

<sup>d</sup> Designación de los VCGs correlativa con la de Novas y Cabral (2002) y Pildain, *et al.* (2004).

\*T2n4, T3N21 pertenecen a la especie *A. tamarii* (Sección 4).

### 3.3 Corrientes

Se obtuvieron mutantes *nit* de 80 de los 90 aislamientos de *A. flavus* obtenidos para la zona de Corrientes, los 10 restantes fueron retirados del estudio ya que no produjeron

sectores *nit* en clorato. De estos 80 aislamientos, 21 sólo produjeron un solo tipo de mutante, 13 produjeron más de un tipo pero no fueron autocompatibles y los 46 restantes resultaron autocompatibles. Los resultados de las confrontaciones entre los aislamientos autocompatibles se muestran en la Tabla 3.6. En ésta se indica el resultado final y no los tipos de mutantes y números de mutantes que se manejaron.

Las 46 cepas de *A. flavus* analizadas para esta zona (29 de maní cultivado y 17 de maní nativo) se distribuyeron en 11 VCGs, 6 de los cuales estuvieron conformados por más de una cepa (VCG R2 a W2) y los 5 restantes solo por una cepa (VCGs X2 a B3). Los VCGs que incluyeron más aislamientos fueron el R2 y el S2 con 19 y 9 aislamientos respectivamente. Los aislamientos procedentes de plantas cultivadas de maní se distribuyeron en 5 VCGs, siendo el más frecuente el VCG R2 con 19 cepas. Mientras que los aislamientos de las plantas nativas conformaron 6 VCGs, de los cuales el VCG S2 fue el que incluyó mayor número de cepas (n= 9).

El índice de diversidad genética para Corrientes resultó ser igual a 0.24. Si se toman en cuenta los aislamientos de maní cultivado por un lado y los de maní nativo por otro, el índice resultante para cada tipo de aislamiento de *A. flavus* dependiendo el sustrato es de 0.17 y 0.35 respectivamente (Tabla 3.6).

Como puede observarse en la Figura 3.2, los VCGs conformados por cepas aisladas de plantas de maní cultivadas no formaron parte de los VCGs de cepas de plantas nativas y viceversa. Además no se observó ningún VCG que incluyera aislamientos procedentes de diferentes especies de *Arachis* nativas, así aquellos grupos con más de un aislamiento como S2, U2 y W2 quedaron formados por cepas provenientes de *A. glabrata* y *A. correntina* respectivamente. Los grupos R2 y T2 presentaron aislamientos de maníes cultivados y dentro de ellos puede observarse a cepas proveniente tanto de hoja como de semilla. Además, quedaron incluidos aislamientos de diferentes campos ya que en R2 hay aislamientos de Empedrado (E), San Luis del Palmar (SLP), San Miguel (SM) y Bella Vista (BV) (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6.** VCGs conformados por aislamientos de *A. flavus* de plantas nativas y cultivadas de maní de la zona de Corrientes.

<i>Cepa</i> <sup>a</sup>	<i>Esclerocios</i> <sup>b</sup> <i>otipo</i> <sup>c</sup>	<i>Quimi</i>	<i>VCG</i> <sup>d</sup>	<i>Aislamiento/ VCG</i>	<i>Origen</i>
SLP1	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SLP6	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SLP8	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SLP9	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SM2	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SM4	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SM5	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SM8	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SM13	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
BV3	L	I	R2	19	hoja <i>A. hypogaea</i>
BV4	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
BV6	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
BV7	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
EH2	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
EH6	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
EH8	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
EH13	L	I	R2		hoja <i>A. hypogaea</i>
EF8	L	I	R2		semilla <i>A. hypogaea</i>
EF11	L	I	R2		semilla <i>A. hypogaea</i>
M12H1	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H3	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H7	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H8	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H11	L	IV	S2	9	hoja <i>A. glabrata</i>
M12H13	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H14	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H17	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H20	L	IV	S2		hoja <i>A. glabrata</i>
SLP3	L	I	T2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SLP4	ND	I	T2		hoja <i>A. hypogaea</i>
SLP5	ND	I	T2	5	hoja <i>A. hypogaea</i>
SM10	L	I	T2		hoja <i>A. hypogaea</i>
EF5	ND	I	T2		semilla <i>A. hypogaea</i>
M12H2	ND	V	U2		hoja <i>A. glabrata</i>
M12H5	ND	V	U2	3	hoja <i>A. glabrata</i>
M12H6	ND	IV	U2		hoja <i>A. glabrata</i>
EF1	L	V	V2		semilla <i>A. hypogaea</i>
EF3	ND	V	V2	3	semilla <i>A. hypogaea</i>
EF7	ND	V	V2		semilla <i>A. hypogaea</i>
M9H19	ND	I	W2		hoja <i>A. correntina</i>
M9H23	ND	I	W2	2	hoja <i>A. correntina</i>
M2H1	L	I	X2	1	hoja <i>A. villosa</i>
M6H15	ND	I	Y2	1	hoja <i>A. villosa</i>
M9H24	ND	I	Z2	1	hoja <i>A. correntina</i>
EF10	L	IV	A3	1	semilla <i>A. hypogaea</i>
EF13	L	I	B3	1	semilla <i>A. hypogaea</i>

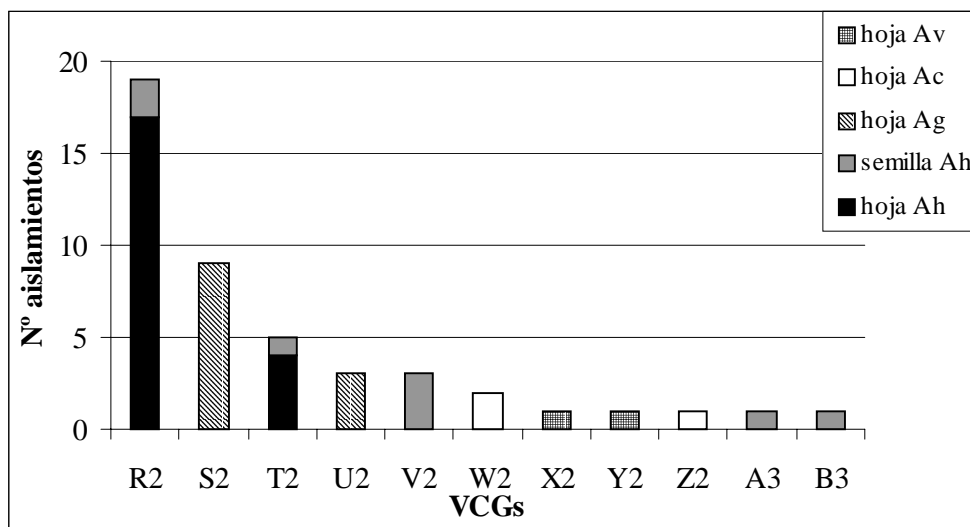
<sup>a</sup> Siglas adjudicadas para los aislamientos de *A. flavus* de la zona de Corrientes.

<sup>b</sup> L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

<sup>c</sup> Quimiotipo I: AFB y CPA; II: AFB, AFG y CPA; IV: CPA (Vaamonde *et al.*, 2003).

<sup>d</sup> Designación de los VCGs correlativa con la de Novas y Cabral (2002) y Pildain, *et al.* (2004).

**Figura 3.2.** Origen y frecuencia de los aislamientos de *A. flavus* que componen distribuidos en los VCGs establecidos para la zona de Corrientes.



Av: *A. villosa*; Ac: *A. correntina*; Ag: *A. glabrata*; Ah: *A. hypogaea*.

Al igual que para las otras zonas analizadas, todas las cepas integrantes de un mismo VCG pertenecen al mismo quimiotipo, con excepción del VCGU2 donde dos de los aislamientos pertenecen al quimiotipo V y el restante al quimiotipo IV. En cuanto a la capacidad de producir esclerocios, los VCGs R2 y S2 se caracterizaron por incluir aislamientos que producen esclerocios tipo L, mientras que los VCGT2 y V2 presentaron aislamientos productores y no productores bajo las condiciones de este estudio. y además todas comparten la capacidad de producir o no esclerocios.

#### 4. Establecimiento de VCGs de *A. flavus* en la Argentina

Una vez establecidos los VCGs para cada zona agroecológica se procedió a enfrentar cada cepa autocompatible obtenida para una zona con las otras caracterizadas para las demás áreas. Así los 146 aislamientos autocompatibles obtenidos (25 de Formosa, 50 de Salta, 46 de Corrientes y 25 de Córdoba) se distribuyeron en 78 VCGs representantes de la diversidad genética de *A. flavus* presentes en las zonas maniseras. El índice de diversidad de VCGs para *A. flavus* proveniente de semilla y hojas de maní resultó igual a 0.53.

**Tabla 3.7.** Cepas de *A. flavus* aisladas de semillas y hojas de maní cultivado y hojas de maní nativo, representativas de la diversidad de VCGs en la zona manisera de la Argentina.

VGC <sup>a</sup>	Cepa <sup>b</sup>	Quimio- -tipo <sup>c</sup>	Escleroc. <sup>d</sup>	Origen <sup>e</sup>	Año <sup>f</sup>	VGC <sup>a</sup>	Cepa <sup>b</sup>	Quimio- -tipo <sup>c</sup>	Escleroc. <sup>d</sup>	Origen <sup>e</sup>	Año <sup>f</sup>
R2	SLP1	I	L	S. L. Palmar CO	2005	V2	EF3	V	...	Empedrado CO	2005
	SLP6	I	L	S. L. Palmar CO	2005		EF7	V	...	Empedrado CO	2005
	SLP8	I	L	S. L. Palmar CO	2005	D	M36N1	I	L	Matorrales CD	1993
	SLP9	I	L	S. L. Palmar CO	2005		M3N1X	I	L	Gigena CD	1993
	SM2	I	L	S. Miguel CO	2005	E	M22N3	II	S	Manfredi CD	1993
	SM4	I	L	S. Miguel CO	2005		M36N2	II	S	Matorrales CD	1993
	SM5	I	L	S. Miguel CO	2005	P	LLF14	I	L	Las Lomitas FO	2001
	SM8	I	L	S. Miguel CO	2005		LLF40	I	L	Las Lomitas FO	2001
	SM13	I	L	S. Miguel CO	2005	Q	LLF5	IV	...	Las Lomitas FO	2001
	BV3	I	L	B. Vista CO	2005		LLF30	IV	...	Las Lomitas FO	2001
	BV4	I	L	B. Vista CO	2005	<b>R</b>	<b>LLF37</b>	<b>II</b>	<b>S</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>
	BV6	I	L	B. Vista CO	2005		<b>M5N9</b>	<b>II</b>	<b>S</b>	<b>Rio IV CD</b>	<b>1993</b>
	BV7	I	L	B. Vista CO	2005	F1	T2N4	IV	...	Tartagal SA	2001
	EH2	I	L	Empedrado CO	2005		T3N21	IV	...	Tartagal SA	2001
	EH6	I	L	Empedrado CO	2005	G1	T4N33	I	S	Tartagal SA	2001
	EH8	I	L	Empedrado CO	2005		T4N50	I	S	Tartagal SA	2001
	EH13	I	L	Empedrado CO	2005	W2	M9H19	I	...	Itatí CO	2004
	EF8	I	L	Empedrado CO	2005		M9H23	I	...	Itatí CO	2004
	EF11	I	L	Empedrado CO	2005	F	M2N1	I	L	Holmerg CD	1993
S2	M12H1	IV	L	Empedrado CO	2004	G	M10A	I	L	Manfredi CD	1993
	M12H3	IV	L	Empedrado CO	2004	H	M10N3	I	L	Charras CD	1993
	M12H7	IV	L	Empedrado CO	2004	I	M11N3	I	...	V. Rosario CD	1993
	M12H8	IV	L	Empedrado CO	2004	J	M14N1	I	...	Las perdices CD	1993
	M12H11	IV	L	Empedrado CO	2004	K	M14N2	I	...	Las perdices CD	1993
	M12H13	IV	L	Empedrado CO	2004	L	M29N3	I	...	V. Ascasubi CD	1993
	M12H14	IV	L	Empedrado CO	2004	M	M40N1	II	S	Oncativo CD	1993
	M12H17	IV	L	Empedrado CO	2004	S	LLF1	IV	...	Las Lomitas FO	2001
	M12H20	IV	L	Empedrado CO	2004	T	LLF7	IV	L	Las Lomitas FO	2001
<b>N</b>	<b>LLF8</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>	U	LLF10	I	L	Las Lomitas FO	2001
	<b>LLF9</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>	V	LLF13	IV	L	Las Lomitas FO	2001
	<b>LLF25</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>	W	LLF15	I	...	Las Lomitas FO	2001
	<b>LLF36</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>	X	LLF21	I	L	Las Lomitas FO	2001
	<b>T1N7</b>	<b>I</b>	<b>...</b>	<b>Taratagal SA</b>	<b>2001</b>	Y	LLF16	I	L	Las Lomitas FO	2001
	<b>T3N9</b>	<b>IV</b>	<b>L</b>	<b>Tartagal SA</b>	<b>2001</b>	A1	LLF33	IV	...	Las Lomitas FO	2001
A	M35N1A	IV	...	Ticino CD	1993	B1	LLF34	I	L	Las Lomitas FO	2001
	M34N2	I	...	La Carlota CD	1993	H1	T1N13	I	...	Tartagal SA	2001
	M15N3	I	...	Carnerillo CD	1993	II	T1N15	I	...	Tartagal SA	2001
	M11N1	IV	...	V. Rosario CD	1993	J1	T1N17	IV	...	Tartagal SA	2001
	M11N1X	IV	...	V. Rosario CD	1993	K1	T1N34	II	S	Tartagal SA	2001
B	M12N1	I	L	G. Cabrera CD	1993	L1	T3N4	I	L	Tartagal SA	2001
	M6N1	I	L	Río IV CD	1993	M1	T3N6	IV	...	Tartagal SA	2001
	M32N1	I	L	Alejandro CD	1993	N1	T3N8	I	L	Tartagal SA	2001
	M38N1	I	L	Colazo CD	1993	O1	T3N11	I	L	Tartagal SA	2001
	M29N1	I	L	V. Ascasubi CD	1993	P1	T3N15	I	L	Tartagal SA	2001
T2	SLP3	I	L	S. L. Palmar CO	2005	Q1	T3N20	I	...	Tartagal SA	2001
	SLP4	I	...	S. L. Palmar CO	2005	R1	T3N23	I	L	Tartagal SA	2001
	SLP5	I	...	S. L. Palmar CO	2005	S1	T3N25	I	...	Tartagal SA	2001
	SM10	I	L	S. Miguel CO	2005	T1	T3N26	I	...	Tartagal SA	2001
	EF5	I	...	Empedrado CO	2005	U1	T3N28	I	L	Tartagal SA	2001
O	LLF3	I	...	Las Lomitas FO	2001	V1	T3N33	IV	...	Tartagal SA	2001
	LLF17	I	...	Las Lomitas FO	2001	W1	T3N34	II	S	Tartagal SA	2001
	LLF22	I	...	Las Lomitas FO	2001	X1	T3N53	I	L	Tartagal SA	2001
	LLF35	I	...	Las Lomitas FO	2001	Y1	T4N1	I	L	Tartagal SA	2001
<b>C1</b>	<b>LLF39</b>	<b>II</b>	<b>S</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>	Z1	T4N2	I	L	Tartagal SA	2001
	<b>T1N20</b>	<b>II</b>	<b>S</b>	<b>Tartagal SA</b>	<b>2001</b>	A2	T4N4	I	...	Tartagal SA	2001
	<b>T1N31</b>	<b>II</b>	<b>S</b>	<b>Tartagal SA</b>	<b>2001</b>	B2	T4N5	I	L	Tartagal SA	2001
	<b>T1N33</b>	<b>II</b>	<b>S</b>	<b>Tartagal SA</b>	<b>2001</b>	C2	T4N6	I	L	Tartagal SA	2001
C	M32N4	II	S	Alejandro CD	1993	D2	T4N7	I	L	Tartagal SA	2001
	M38N3	II	S	Colazo CD	1993	E2	T4N13	I	L	Tartagal SA	2001
	M35N2	II	S	Ticino CD	1993	F2	T4N14	IV	L	Tartagal SA	2001
<b>Z</b>	<b>LLF18</b>	<b>IV</b>	<b>L</b>	<b>Las Lomitas FO</b>	<b>2001</b>	G2	T4N16	II	S	Tartagal SA	2001
	<b>T3N24</b>	<b>IV</b>	<b>L</b>	<b>Tartagal SA</b>	<b>2001</b>	H2	T4N25	I	...	Tartagal SA	2001
	<b>T3N27</b>	<b>IV</b>	<b>...</b>	<b>Tartagal SA</b>	<b>2001</b>	I2	T4N29	I	...	Tartagal SA	2001
D1	T1N21	II	S	Tartagal SA	2001	J2	T4N34	II	S	Tartagal SA	2001

	T1N35	II	S	Tartagal SA	2001	K2	T4N39	II	S	Tartagal SA	2001
	T3N44	II	S	Tartagal SA	2001	L2	T4N47	I	L	Tartagal SA	2001
E1	T4N18	II	S	Tartagal SA	2001	M2	T4N49	I	...	Tartagal SA	2001
	T4N32	II	S	Tartagal SA	2001	N2	T4N52	I	L	Tartagal SA	2001
	T4N35	II	S	Tartagal SA	2001	X2	M2H1	I	L	Colón ER	2004
U2	M12H2	V	...	Empedrado CO	2004	Y2	M6H15	I	...	P. I. Libres CO	2004
	M12H5	V	...	Empedrado CO	2004	Z2	M9H24	I	...	Itatí CO	2004
	M12H6	IV	...	Empedrado CO	2004	A3	EF10	IV	L	Empedrado CO	2005
V2	EF1	V	L	Empedrado CO	2005	B3	EF13	I	L	Empedrado CO	2005

<sup>a</sup>Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCGs) asignados utilizando mutantes *nit* de acuerdo a Cove (1976) y modificaciones de Cotty (1994). Designación de los VCGs correlativa con la de Novas y Cabral (2002) y Pildain *et al.* (2004).

<sup>b</sup>Siglas adjudicadas para los aislamientos de *A. flavus* de la Argentina utilizados en este estudio.

<sup>c</sup>I: Quimiotipo I: AFB y CPA; II: AFB, AFG y CPA; IV: CPA (Vaamonde *et al.*, 2003).

<sup>d</sup>L: esclerocios >400µm de diámetro; S: esclerocios <400µm de diámetro; ND: producción no detectada bajo nuestras condiciones de cultivo.

<sup>e</sup>Ubicación de las 4 regiones productoras de maní en la Argentina. CD: Córdoba; FO: Formosa; SA: Salta ; CO: Corrientes.

<sup>f</sup>Año de cultivo y aislamiento.

■ VCGs que incluyen aislamientos de mas de una zona agroecológica.

De 78 VCGs totales sólo cuatro incluyen cepas de mas de una zona agroecológica. Los VCG N, Z y C1 se encuentran conformados por cepas de Formosa y Salta, y el VCG R presenta cepas de Formosa y Córdoba. No se observó ningún VCG que incluyera cepas de Corrientes junto con cepas de otras zonas, como tampoco otro que incluyera cepas de Córdoba y Salta. Lo VCGs N y Z presentan aislamientos productores de esclerocios tipo L y con quimiotipo I y IV respectivamente, mientras que los VCGs R y C1 cuentan con cepas tipo S y con quimiotipo II. No se encontró ningún VCG que incluyera cepas S y L.

Las 26 cepas de *A. flavus* atípicas se distribuyeron en 13 VCGs dando un índice de diversidad igual a 0.5, mientras que las cepas típicas de *A. flavus* (quimiotipo I, IV o V; productoras de esclerocios tipo L o no productoras) incluidas en los 68 VCGs restantes presentaron un índice muy similar, igual a 0.57.

## 5. Cepas atípicas de Argentina, Australia, Benin y Estados Unidos

Las 26 cepas atípicas de *A. flavus* (quimiotipo II y esclerocios tipo S) autocompatibles caracterizadas para la Argentina (Tabla 3.7) se confrontaron con cepas provenientes de otros países (Tabla 3.3) dando como resultado 25 VCGs, los 13 establecidos para la Argentina (Tabla 3.7) mas 12 VCGs con un solo aislamiento cada uno correspondiente a cada cepa proveniente de otro país. No se conformó ningún VCG que

incluyera cepas de diferentes países. Además, las cepas provenientes de Estados Unidos, Australia y Benin no fueron compatibles entre sí.

## DISCUSIÓN

Los estudios de VC en la Argentina son escasos, para *A. flavus* éstos se han enfocado principalmente en aislamientos de la zona manisera de Córdoba. El primer trabajo realizado fue de Novas y Cabral (2002) seguido por el de Barros *et al.* (2005), los cuales aportan resultados muy similares en cuanto a diversidad de VCGs y relación entre cepas típicas y atípicas de la especie. Este es el primer trabajo donde se aborda el estudio de VC de aislamientos de *A. flavus* provenientes de semillas de maní de diferentes zonas agroecológicas, como también la comparación de aislamientos procedentes de distintos órganos de la planta y de especies nativas de *Arachis*. Además el presente estudio permite relacionar la producción de micotoxinas, eclerocios, diversidad genética, origen agroecológico y sustratos de los aislamientos de *A. flavus*.

Al igual que en estudios previos, se obtuvieron al menos dos tipos de mutantes en la mayoría de las cepas de *A. flavus*, aunque muchas de éstas debieron ser descartadas del análisis por no cumplir el requisito de autocompatibilidad. De las mencionadas cepas se obtuvo mayormente sólo mutantes *niaD* y por lo tanto no se pudo determinar si son o no autocompatibles. Horn y Greene (1995) aislaron al menos dos tipos de mutantes de todas las cepas a excepción de dos *A. tamarii*, Bayman y Cotty (1991b) descartaron 15 cepas de un total de 105, mientras que Filey *et al.* (1995) reconocieron 157 cepas a las que no pudieron asignar a ningún VCG por la carencia de mutantes complementarios.

En el caso donde se obtuvo al menos dos tipos de mutantes diferentes para un mismo aislamiento, y éstos no resultaron compatibles, la falta de complementación podría deberse a una mutación doble. Un argumento alternativo es que la resistencia al clorato resultara en la inactivación del mecanismo de la asimilación del nitrato (Cove, 1976a; Cove, 1979). Gordon y 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, aun cuando dichas cepas en su estado salvaje pudieron 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 sólo algunas de las cepas compatibles. Ante las dificultades que estos resultados representan para un estudio poblacional, estos autores postulan la necesidad de desarrollar un *set* de testigos para cada cepa, los cuales deben presentar un rango amplio de compatibilidad. Además señalan que 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 mas de un mutante disponible, consideramos que disminuimos la posibilidad de falsos negativos. En varios trabajos se observó la existencia de cepas autoincompatibles (Correll *et al.*, 1987; Jacobsen y Gordon, 1990). 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 necesita que la cepa liberada sea incapaz de formar un heterocarionte con otra de la población (Broker *et al.*, 1991).

Según Correll *et al.* (1987), los mutantes que presentan un escaso crecimiento en hipoxantina, denominados *cnx* para las especies de *Aspergillus*, son los testigos mas confiables en estudios de VC y sugieren el aislamiento de uno de estos mutantes para cada cepa como medio para evitar falsos negativos. Sin embargo, como se señaló 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 pero, por otro lado, es el que se aisló en menor proporción. Horn y Greene (1995) realizando comparaciones de todos los *nit* identificados dentro de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. tamarii*, reconocieron que las frecuencias de los tres tipos de mutantes fueron significativamente diferentes y concluyeron que el número de mutantes de cada tipo

obtenidos por esta técnica es el siguiente: *niaD>nirA>cnx*. Nuestros resultados sobre *A. flavus* concuerdan con estas observaciones. El mecanismo por el cual se encuentran diferencias entre aislamientos en cuanto al número y tipo de mutantes que se obtienen no ha sido encontrado. Se ha sugerido que podría estar relacionado con el tamaño físico de los genes o que algún loci puede ser más susceptible a la mutación que otros (Klitich & Leslie, 1988). También, Korolev y Katan (1997) relacionaron esta diferencia en *Verticillium dahliae* Klebahn, con la edad del cultivo y las condiciones de preservación y almacenamiento del aislamiento.

Las 146 cepas analizadas que resultaron compatibles se agruparon en 78 VCGs. Estos valores dan una diversidad de 0.53, similar al observado por Papa (1986) y Horn y Greene (1995) quienes para diferentes zonas de EEUU obtuvieron un valor de 0.5 y 0.69 respectivamente. En un trabajo realizado durante los años 1987, 1988 y 1989 en un campo de algodón en Arizona (EEUU) 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), comprobando de esta manera que la diversidad también es variable en escala temporal. La alta diversidad genética de *A. flavus* de este estudio de CV, puede estar indicada también por la gran cantidad de VCGs que incluyen solo un aislamiento (55 de 78 VCGs totales, Tabla 3.7) . De los resultados obtenidos en nuestro estudio observamos que la población de Salta (0.8) es mucho más variable que la de Corrientes (0.24), y que los índices para Formosa y Córdoba son muy similares (0.64 y 0.56 respectivamente). Esto permitiría sugerir que la variabilidad depende de la zona agroecológica y del año que se analiza, ya que las muestras de Salta y Formosa provienen de la cosecha de 2001 y sus índices son diferentes, mientras que los aislamientos de Córdoba y Corrientes se realizaron en diferentes años y los índices también son distintos. El índice de diversidad genética para Salta es mucho mayor que el de Córdoba, el tamaño de las dos áreas productoras de maní es muy diferente, siendo el área manisera en Córdoba mucho más extensa que la de Salta. Este resultado muestra que un área pequeña puede estar integrada por individuos genéticamente distintos, lo que apoya las conclusiones de Bayman & Cotty (1991b).

Solo 4 VCGs resultaron estar conformados por cepas de diferentes regiones (Tabla 3.7), 2 VCGs que agruparon cepas atípicas y los dos restantes cepas típicas productoras de

esclerocios tipo L. Ninguna cepa proveniente de Corrientes fue compatible con otra proveniente de otra región. La distribución de los VCGs no presenta ningún patrón geográfico claro, Papa (1986) sugirió que cuantas más muestras se tomen a través de un amplio rango geográfico es esperable que muchos más VCGs sean detectados y que los miembros de alguno de los VCGs puedan estar ampliamente dispersos. Estos VCGs que incluyen aislamientos de diferentes regiones agroecológicas y presentan genotipos idénticos sugieren un componente clonal muy fuerte dentro de estos linajes (Mc Alpin *et al.*, 2005). De acuerdo con Horn y Dorner (1999), en un estudio realizado con aislamientos de *A. flavus* de suelo de diferentes estados de EEUU, los miembros de los VCGs interregionales podrían haber divergido unos de otros pero mantener los mismos alelos que controlan la VC. Sin embargo la baja frecuencia de VCGs interregionales sugiere que fuerzas selectivas en *A. flavus* pueden ocurrir en respuesta a un multitud de parámetros ambientales (Horn *et al.*, 1996). Orum *et al.* (1997) postularon que la temperatura, condiciones de suelo, horas de luz, historia de cultivos, niveles de insectos, frecuencia de precipitaciones y prácticas agroalimentarias pueden influenciar las poblaciones de *A. flavus*. Así los mismos factores que influirían en las frecuencias de las especies de *Aspergillus* (Sección 1 pag. 52 - 55), como también en los porcentajes de cepas productoras de aflatoxinas y esclerocios (Sección 2, pag. 75 - 77), en el campo podrían actuar además sobre la variabilidad intraespecífica de *A. flavus*.

El clima de las zonas analizadas es diferente, siendo la zona de Corrientes la más húmeda (Tabla 1, Sección 1). Para la zona manisera de Córdoba la temperatura media es inferior con respecto a las otras zonas analizadas, y el promedio de precipitaciones es similar a los de Formosa y Salta (Tabla 1.1, Sección 1). Las latitudes, otro parámetro asociado a la variabilidad en *A. flavus*, donde están ubicadas las áreas maniseras son diferentes como también las prácticas agroalimentarias. El cultivar que se utiliza en Corrientes es distinto al de las otras zonas, y el tipo de cultivo en forma de "huerta" que se observa en esta zona requiere de prácticas totalmente distintas a las otras zonas donde el maní es un cultivo extensivo. Estas comparaciones, como también el resto de los parámetros en los que difieren las zonas, permiten sugerir muy preliminarmente que la variabilidad poblacional de *A. flavus* en nuestro se vería afectada por el conjunto de estos factores, sugiriendo un

aislamiento reproductivo (Bosland & Williams, 1987). Sin embargo, las fuerzas selectivas que favorecen el éxito de las diferentes cepas permanecen sin conocerse.

Con respecto a los aislamientos de *A. flavus* provenientes de plantas nativas de *Arachis*, este estudio constituye el primer registro a nivel mundial donde se analizan genéticamente las poblaciones de *A. flavus* asociadas a plantas no cultivadas. Boyd y Cotty (2001) realizaron un relevamiento de *A. flavus* asociado a *Prosopis* spp., analizando sólo la capacidad toxigénica de estos aislamientos y la posibilidad de que estos árboles actúen como reservorios y fuentes significantes de hongos productores de aflatoxinas. El estudio más similar que hallamos en la bibliografía consultada es el realizado por Katan *et al.* (1994) sobre *F. oxysporum* aislado de plantas silvestres de clavel en Israel. Estos autores sugieren que el cultivo y domesticación tienen efectos cualitativos y cuantitativos en las poblaciones de ese patógeno, pudiendo resultar en cambios poblacionales a través del cultivo, favoreciendo la constitución de ciertos clones particulares. Nuestras observaciones sobre *A. flavus* de *Arachis* nativas, parecen indicar que el sustrato determina las poblaciones de *A. flavus* asociadas. De este modo, a partir de este estudio surge la pregunta sobre la relativa importancia de la VC y la especialización de hospedantes en *A. flavus* como contribución a la divergencia genética y al valor adaptativo, así como también si los genes que gobiernan la VC estarían relacionados con los de la patogenicidad.

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). Horn *et al.* (1996) sugieren 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 esa especie podría ocurrir en respuesta a un gran número de parámetros asociados necesarios para una invasión al hospedante. El alto grado de producción de esclerocios y de aflatoxinas, entre las cepas de

*A. flavus* indicarían que estos caracteres podrían ser selectivamente ventajosos bajo las condiciones del sudoeste de Georgia (EEUU).

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). De esta manera la heterocariosis y la parasexualidad (recombinación mitótica o somática) serían procesos importantes en la variabilidad de las formas anamórficas, que carecen de reproducción sexual, brindando la diversidad intraespecífica observada en los estudios de *A. flavus*, por ejemplo (Glass, *et al.*, 2000).

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). 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 y Cotty (1993) usando la técnica de RAPD confirmaron la estrecha relación entre cepas de *A. flavus* dentro de VCGs. Jacobsen y Gordon (1990) obtuvieron resultados similares en *F. oxysporum*.

De nuestros resultados surge que todas las cepas integrantes de un mismo VCG pertenecen al mismo quimiotipo y comparten además, la capacidad o no de producir esclerocios. Estas observaciones concuerdan con otros estudios donde han asociado a los VCGs con la producción de aflatoxinas y esclerocios (Papa, 1986; Bayman & Cotty, 1991b; Horn & Dorner, 1999). Chang *et al.* (2005) observaron que aislamientos pertenecientes al mismo VCG tienen idénticos patrones de delección del cluster de genes de biosíntesis de aflatoxinas, pero estos patrones también se encuentran en otros aislamientos de otros VCGs. Estos autores postulan que los patrones de delección pueden haberse formado antes de la divergencia en diferentes VCGs o bien que, secuencias idénticas de delección pueden haber ocurrido independientemente por un mecanismo preciso luego de que el progenitor haya divergido en diferentes VCGs.

Unos pocos VCGs agruparon aislamientos con quimiotipos diferentes y con productores o no productores de esclerocios (VCGs N, A T2, G y Z) y dentro de éstos, sólo

un aislamiento presentó divergencia con el resto de los miembros del grupo. Nosotros suponemos que como la técnica de Filtenborg y Frisvad (1980) es una técnica rápida y cualitativa donde la ocurrencia de falsos negativos es posible debido a que pueden no ser detectados niveles bajos de producción de aflatoxinas, tendríamos errores a causa de la técnica utilizada con lo cual estudios de cuantificación más precisos serían necesarios. En cuanto a la producción de esclerocios por parte de *A. flavus*, es reconocido que esta característica se da en función de las condiciones de cultivo (Horn *et al.*, 1996) y aislamientos identificados en este estudio como no productores pueden producir esclerocios en otro medio o en otras condiciones.

En ninguno de los VCGs conformados durante el estudio, las cepas de *A. flavus* típicas y atípicas quedaron comprendidas en el mismo grupo. Esto concuerda con los resultados presentados por Bayman y Cotty (1993), que plantean que, aunque las cepas estarían estrechamente relacionadas con base en su complementariedad de ADN, la ausencia de CV entre ellas sugeriría aislamiento genético. Los resultados de este trabajo verifican la eficacia de la técnica de VC y apoyan la hipótesis de mantener a estos organismos como especies independientes (Geiser *et al.*, 2001), teniendo en cuenta además la variabilidad morfológica, de producción de extrólitos y caracteres moleculares (Sección 4).

Cuando se compararon las cepas S de la Argentina y otros países, no se conformó ningún VCG entre ellas. Con respecto a las cepas de EEUU, productoras sólo de aflatoxinas tipo B, es congruente que no se incluyeran en ningún VCG con las cepas productoras de AFB y AFG, mientras que las otras cepas provenientes de Australia y Benin, que sí producen ambos tipos de aflatoxinas y fenotípicamente son similares a las de Argentina, al pertenecer a distintos VCGs se comportan como aislamientos típicos de *A. flavus* donde la gran variabilidad genética permite obtener un alto número de VCGs. Estos resultados se contraponen con los obtenidos para *A. caelatus* por McAlpin *et al.* (2005) quienes observaron que el VCG1 comprendía aislamientos de EEUU y Japón sugiriendo un componente clonal muy fuerte dentro de este linaje, como también que los integrantes de este VCG tendrían una habilidad competitiva superior permitiendo adaptarse a diferentes condiciones y establecerse como el más frecuente en regiones tan distantes del globo.

En el presente estudio se observaron cinco aislamientos con quimiotipo V (no productores de aflatoxinas ni CPA) incluidos en dos VCGs (U2 y V2). Cepas atoxigénicas de *A. flavus* están siendo utilizadas como uno de los biopesticidas más importantes para reducir la contaminación de algodón con aflatoxinas (Cleveland *et al.*, 2003). Las cepas atoxigénicas funcionan excluyendo por competencia a las cepas productoras de aflatoxinas del ambiente agrícola (Cotty *et al.*, 1994). El hecho de que los aislamientos que conforman un VCG presenten el mismo patrón de producción de aflatoxinas puede ser de importancia en el desarrollo de estrategias de control biológico. Geiser *et al.* (1998) indicaron que la recombinación tiene importantes implicancias en las estrategias de control biológico, particularmente en la adición de cepas atoxigénicas, debido al potencial de cruzamiento entre las cepas nativas y las introducidas. Basados en las barreras de incompatibilidad vegetativa, el potencial para el intercambio genético sería mucho mayor entre aislamientos dentro de un mismo VCG que entre aislamientos de diferentes VCGs. Por otra parte Bock y Cotty (1999) postularon que el uso de varios VCGs atoxigénicos puede ser más efectivo para el manejo de cepas toxigénicas que el uso de un solo VCG, provocando un desplazamiento superior de los productores de aflatoxinas y formando comunidades fúngicas modificadas con estabilidad incrementada.

VC ha sido utilizada ampliamente para el establecimiento de la estructura genética de las poblaciones fúngicas, y también como un predictor de grupos cladísticos (Leslie, 1993; Koenig *et al.*, 1997). Algunos estudios que comparan VC y técnicas moleculares apoyan la validez de los VCGs como caracteres para la estimación del parentesco entre miembros de una especie (Bayman & Cotty, 1993; McAlpin & Mannarelli, 1995; McAlpin *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos demuestran que los VCGs son un marcador multilocular efectivo siendo particularmente útil para caracterizar estructura genética de poblaciones de *A. flavus* en la Argentina, donde el costo y las condiciones de laboratorio limitan el número de aislamientos que pueden ser caracterizados por métodos moleculares. Estudios de VC pueden ayudar a medir el grado de transferencia horizontal de genes que puede ocurrir entre genotipos diferentes o similares de *A. flavus*. Un mejor entendimiento

de la variabilidad genética y la estructura poblaciones entre y dentro de poblaciones en el campo puede revelar la manera mas efectiva de manejar este patógeno tan importante.

## CONCLUSIONES PARCIALES

- La variabilidad genética varía entre poblaciones dependiendo de las características ambientales, temporales y agroecológicas, demostrando que las poblaciones de *A. flavus* se encuentran en constante cambio temporal y espacial. Las 4 zonas agroecológicas de Argentina estudiadas, difieren en características tales como: temperatura media, latitud, altura, tipo e historia del suelo, secuencia de cultivos, niveles de insectos, frecuencia de precipitaciones y prácticas culturales, factores que han sido señalados como parámetros importantes que pueden determinar la composición de las poblaciones de *A. flavus*.
- Se comprueba una estrecha correlacion entre los VCGs identificados, la producción de aflatoxinas y de CPA, asi como con la producción de esclerocios.
- Las poblaciones de *A. flavus* son muy diversas y se ven afectadas por las condiciones ambientales de cada región. La diversidad no estaría relacionada tanto con la temporalidad como con la región agroecológica.
- La cepas atípicas de *A. flavus* deberían considerarse como un nueva especie debido a que presentan una estructura poblacional propia y no conforman VCGs con las cepas típicas.
- El bajo número de VCGs que incluyen cepas de diferentes regiones indicaría que el genotipo de *A. flavus* está ampliamente disperso, pero las cepas pertenecientes al mismo VCG son genéticamente idénticas. Estas cepas



pueden haber divergido una de otra pero siguen manteniendo los mismos  
alelos que gobiernan VC.



## INTRODUCCIÓN DE LA SECCION

La sección *Flavi* cuenta con las especies productoras de toxinas más importantes desde el punto de vista económico y de salud humana y animal. Por lo tanto es muy relevante conocer su taxonomía y sus relaciones filogenéticas y toxigénicas (Nielsen & Smedsgaard, 2003).

La secuenciación parcial del gen de  $\beta$ -tubulina ha sido ampliamente utilizada en filogenias moleculares del género *Aspergillus* (Peterson *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003) como se muestra en el punto 4.6 de la introducción general de esta tesis. Los genes de  $\beta$ -tubulina son apropiados para estudios genético-moleculares iniciales por varias razones: están presentes en todos los eucariotas conocidos, tienen niveles de expresión altos y son regulados a nivel de la estabilidad del mRNA (Yen *et al.*, 1988).

El producto del gen de  $\beta$ -tubulina constituye el principal componente estructural de microtubúlos, componentes críticos del esqueleto nuclear y citoplasmático necesarios para la mitosis, meiosis y otros aspectos del desarrollo celular y la movilidad (Byrd *et al.*, 1995). Las moléculas de tubulina son heterodímeros que constan de dos subunidades globulares fuertemente unidas llamadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina (Atkins, 1978). En la mayoría de los organismos la tubulina está codificada por una familia génica (Alberts *et al.*, 1992) y su secuencia está altamente conservada. Esta característica refleja en parte los límites estructurales impuestos por la gran cantidad de proteínas a las que se unen (Alberts *et al.*, 1992).

El término “extrolito” fue establecido por Samson y Frisvad (2005) a partir de su extensivo estudio utilizando los perfiles de metabolitos secundarios fúngicos. Un extrolito es un compuesto químico liberado al exterior, producido durante la diferenciación de un organismo vivo. Los extrolitos son usualmente excretados, pero pueden ser acumulados en la pared celular o membrana. Todos los extrolitos tienen una distribución taxonómica limitada, mientras que los intrólitos (= metabolitos primarios = metabolitos generales) son distribuidos ampliamente, ejemplos de intrólitos son el ergosterol para los organismos fúngicos y el oxalacetato en todos los organismos vivos. Dado que los extrolitos son liberados al exterior directamente, están involucrados en interacciones entre el organismo productor y cualquier otro organismo o el ambiente abiótico.

Los metabolitos secundarios (extrolitos), generalmente reconocibles como colores difusibles, colores en el reverso de las colonias y exudados coloreados, han tenido un rol especial en la taxonomía fúngica (Samson & Frisvad, 2005). Los colores, especialmente el de los conidios, son registrados como parte de la morfología y pueden ser subdivididos en melanina y complejos proteicos-melanina que dan al conidio fúngico su forma física, dureza y protección de la radiación y otros colores (y volátiles) que actúan frecuentemente como señales ecológicas (Wicklow & Wilson, 1986).

En esta sección se presentan resultados de estudios morfológicos, moleculares y toxigénicos que forman parte de un estudio polifásico de la taxonomía de la sección *Flavi*.

Esta sección del trabajo de tesis fue realizada durante una estancia en los laboratorios de los Dres. Robert Samson y Jens Frisvad en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Holanda y Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Lyngby, Dinamarca, respectivamente, en el marco de una beca otorgada por la International Union of Microbiological Societies (IUMS) – UNESCO.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Conocer las relaciones entre las especies de la sección *Flavi*, en base a características morfológicas.
- Obtener el perfil de producción de extrolitos de la sección *Flavi*.
- Obtener una filogenia molecular de la sección *Flavi*, en base a las secuencias nucleotídicas parciales del gen  $\beta$ -tubulina.
- Analizar el grado de correlación de características macro y micromorfológicas, producción de extrolitos y caracterización molecular.
- Aportar información que permita validar o rechazar las propuestas taxonómicas tradicionales.

## HIPÓTESIS

- Las características morfológicas, perfil de producción de extrolitos y secuenciación parcial del gen de  $\beta$ -tubulina son estudios que permiten clarificar la taxonomía de la sección *Flavi*.
- *A. flavus* “atípicos” constituyen una nueva especie dentro de la sección *Flavi*.
- *A. parasiticus* II constituyen una nueva especie dentro de la sección *Flavi*.
- Existen especies dentro de la sección *Flavi* que son sinónimos de *A. flavus*, *A. nomius* y *A. parasiticus*.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Cepas utilizadas en el estudio

Se analizaron un total de 97 cepas de *Aspergillus* spp. (Tabla 4.1 y 4.2). Los aislamientos utilizados se obtuvieron del cepario del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), del cepario del Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark (IBT), o fueron aislados a partir de semillas y hojas de maní cultivado (*Arachis hypogaea*) y hojas de especies autóctonas de maní (*A. villosa*, *A. correntina*, *A. glabrata*, y *A. burkartii*) de la República Argentina como se detalla en la Sección 1. Las cepas utilizadas se eligieron en base a su representatividad dentro de la sección *Flavi*, grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) de *A. flavus* y por haber sido aisladas de diferentes hospedantes y zonas agroecológicas dentro de Argentina. Todas las cepas utilizadas son preservadas en la colección del CBS y en BAFC cult (abreviaturas de acuerdo con Holmgren, 1990).

Para la caracterización morfológica y el análisis filogenético se utilizaron 26 cepas de Argentina y 42 del CBS e IBT y para el análisis del perfil de producción de extrolitos 55 cepas de Argentina y 18 del CBS. Para el análisis de extrolitos se utilizaron más cepas de Argentina para que estuvieran representados todos los grupos de compatibilidad vegetativa que tuvieran más de un aislamiento (Sección 3), con el objetivo de comprobar si los grupos que se formaron están asociados a un determinado perfil de extrolitos; las 18 cepas del CBS para el análisis de extrolitos fueron seleccionadas para que todas las especies y variedades de la sección pudieran ser comparadas.

## 2. Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica, los aislamientos se inocularon de una caja de Petri de 90mm de diámetro conteniendo agar-Czapek extracto de levadura (CYA), agar-sucrosa extracto de levadura (YES), agar- extracto de malta (MEA) y agar-avena (OA) (anexo pag. I y II) y se incubaron en cámara de cultivo a 25°C y en CYA a 37°C en oscuridad. Se analizaron caracteres macro y micromorfológicos cuando los cultivos alcanzaron 7 y 14 días de crecimiento. Los caracteres micromorfológicos (Estípites, vesícula, métulas, fiálides, conidios) se evaluaron sobre 30 observaciones de cada aislamiento utilizado. Para la inoculación se partió de cultivos en tubo pico de flauta conteniendo MEA, se tomó con ansa una porción de agar con cultivo y se colocó en un tubo conteniendo malta peptona al 2% (anexo pag. II) se llevó a vortex durante 5 segundos y se inoculó cada caja de Petri en 3 puntos equidistantes (Samson *et al.*, 2000).

**Tabla 4.1.** Aislamientos de la sección *Flavi* de Argentina ( $n= 55$ ) utilizados para caracterización morfológica, análisis de extrólitos y estudio filogenético.

<i>Aislamiento</i> <sup>a</sup>	Sustratob	<i>Especie</i> <sup>c</sup>
M34N2 = CBS 117623	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<b>A. flavus</b>
M12N1 = CBS 117622	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i>
M6N1 = CBS 117630	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i>
M29N3 = CBS 117621	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i>
M36N1	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i>
M15N3	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF1	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF3	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF5 = CBS 117632	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF8	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF13	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF14	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF17	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
LLF18	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i>
T3N6 = CBS 117631	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i>
T3N9	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i>
T3N24	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i>
T4N6	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i>
T4N29	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i>
BV1	Hoja <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
BV2	Hoja <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
SM1	Hoja <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
SLP1	Hoja <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
SLP2	Hoja <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
M9H4	Hoja <i>A. correntina</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
EH1	Hoja <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
M12H2 <sup>1</sup>	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
M12H5 = CBS 117624	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
ESN1	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
ESN2	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. flavus</i>
M22N3 = CBS 115635	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
M32N4 = CSB 117634	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
M35N2	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
M40N1 = CBS 117639	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CD, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
LLF37 = CBS 117636	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
LLF39 = CBS 117633	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; FO, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
T1N20 = CBS 117620	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
T1N21	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
T4N18	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
T4N32	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
T4N33 = CBS 117637	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
T4N34	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. flavus</i> “atípico”
ESC1 = CBS 117638	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i>
ESC2	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i>
ESN3 = CBS 117619	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i>
M2H5 = CBS 117617	Hoja <i>A. villosa</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i>
M9H3 = CBS 117618	Hoja <i>A. correntina</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i>
M7H3 = CBS 117610	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i> II
M7H4 = CBS 117611	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i> II
M8H1 = CBS 117612	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i> II
M8H2	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i> II

M8H4	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i> II
M8H5 = CBS 117615	Hoja <i>A. glabrata</i> ; CO, Argentina	<i>A. parasiticus</i> II
T3N21 = CBS 117626	Semilla <i>A. hypogaea</i> ; SA, Argentina	<i>A. tamarii</i>
M13H3 = CBS 117616	Hoja <i>A. burkartii</i> ; CO, Argentina	<b>A. caelatus</b>

<sup>a</sup>Designación de los cultivos de *Aspergillus*: el nombre del aislamiento corresponde a la abreviatura del número de muestra seguido por el número del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands) en los casos en que los aislamientos fueran incluidos en esta colección.

<sup>b</sup>Los aislamientos de la provincia de Córdoba fueron obtenidos por Vaamonde *et al.* (1995).

<sup>c</sup>Los aislamientos descritos como *A. flavus* "atípicos", *A. parasiticus* II y *A. caelatus* no pudieron ser incluidos dentro de una especie ya descrita mediante la observación de características morfológicas realizada en la Sección I.

■ Aislamientos utilizados para el análisis morfológico y filogenético.

**Tabla 4.2.** Aislamientos adicionales de la sección *Flavi* (n= 42) utilizados para caracterización morfológica, análisis de extrolitos y estudio filogenético.

<i>Aislamiento</i> <sup>a</sup>	Sustrato <sup>b</sup>	<i>Especie</i> <sup>c</sup>
CBS 100927 <sup>T</sup>	Celofán; Islas del Pacífico Sur	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>
CBS 117733	Cepa de hospital; Utrecht, Holanda	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>
CBS 116.48	Sustrato desconocido; Holanda	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>
CBS 616.94	Tejido de tumor; Alemania	<b>A. flavus</b> var. <b>flavus</b>
CBS108.30	<i>Saccharum officinarum</i> ; Egipto	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i> (tipo "0")
CBS 110.55 <sup>T</sup>	Contaminante aéreo; Brasil	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i> ( <i>A. fasciculatus</i> )
CBS 542.69	stratigraphic core sample; Japón	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i> ( <i>A. kambarensis</i> )
CBS 485.65 <sup>T</sup>	Manteca; Japón	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>
CBS 242.65	Commeal; South Africa	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>
CBS 117627	<b>Commeal; South Africa</b>	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>
CBS 117.731	<i>Dipodomys spectabilis</i> , USA	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>
CBS 501.65 <sup>T</sup>	Algodón, Lintafelt, UK	<i>A. subolivaceus</i>
CBS 120.51 <sup>T</sup>	Contaminante de cultivos	<i>A. thomii</i>
CBS 100925 <sup>T</sup>	Sustrato desconocido; Japón	<i>A. oryzae</i>
CBS 121.62 <sup>T</sup>	<i>A. hypogaea</i> ; Nigeria	<i>A. parvisclerotigenus</i>
CBS 117732	<i>A. hypogaea</i> ; Nigeria	<i>A. parvisclerotigenus</i>
CBS 100926 <sup>T</sup>	<i>Pseudococcus calceolariae</i> .; Hawaii, USA	<i>A. parasiticus</i>
CBS 115.37 <sup>T</sup>	Sustrato desconocido; Japón	<i>A. parasiticus</i> ( <i>A. chungii</i> )
CBS 260.67 <sup>T</sup>	Sustrato desconocido; Japón	<i>A. parasiticus</i> var. <i>globosus</i>
CBS 100928 <sup>T*</sup>	Salsa de soja; Japón	<i>A. sojae</i>
CBS 100929*	Salsa de soja; Japón	<i>A. sojae</i>
CBS 822.72 <sup>T</sup>	<i>A. hypogaea</i> ; Uganda	<i>A. toxicarius</i>
CBS 561.82	Deposito de löss, USA	<i>A. toxicarius</i>
CBS 580.65 <sup>T</sup>	Suelo; USA	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>
CBS 119.51	Japón	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>
CBS 260.88 <sup>T</sup>	Trigo; USA	<i>A. nomius</i>
CBS 117629	Abeja, USA	<i>A. nomius</i>
CBS 117187 <sup>T</sup>	Excremento de gusano de seda; Japón	<i>A. bombycis</i>
IBT 23535	Excremento de gusano de seda; Japón	<i>A. bombycis</i>
IBT 23537	Excremento de gusano de seda; Indonesia	<i>A. bombycis</i>
CBS 399.93 <sup>T</sup>	Suelo; China	<i>A. zhaoqingensis</i>
CBS 104.13 <sup>T</sup>	Carbón activado	<i>A. tamarii</i>
CBS 104.14	Fruto de <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>A. tamarii</i>
CBS 484.65 <sup>T*</sup>	Contaminante aéreo; Brasil	<i>A. flavofurcatus</i>
CBS 766.97 <sup>T</sup>	Suelo; USA	<i>A. pseudotamarii</i>
CBS 765.97	Suelo; Brasil	<i>A. pseudotamarii</i>



CBS 117625	Suelo de campos de Te; Pref. Miyazaki, Japón	<i>A. pseudotamarii</i>
CBS 117628	Suelo de campos de Te; Pref. Miyazaki, Japón	<i>A. pseudotamarii</i>
CBS 763.97 <sup>T</sup>	Suelo; USA	<i>A. caelatus</i>
CBS 764.97	Suelo; USA	<i>A. caelatus</i>
CBS 151.66 <sup>T*</sup>	Estiércol de <i>Lepus townsendii</i> ; USA	<i>A. leporis</i>
CBS 349.81*	Suelo; USA	<i>A. leporis</i>

<sup>a</sup>Designación de los cultivos de *Aspergillus*. CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands. <sup>T</sup>Aislamientos que fueron designados tipos de las especies establecidas.

\* Aislamientos que no pudieron ser utilizados para el análisis de extrolitos debido a que presentaron contaminaciones en al menos uno de los medios de cultivo analizados.

■ Aislamientos utilizados para el análisis de extrolitos.

Los caracteres macro y micromorfológicos observados son los listados en el ítem 3 de Materiales y Métodos de la sección I. El color de la colonia fue observado a ojo desnudo con la ayuda de la carta de colores de Methuen (Kornerup & Wanscher, 1978). Las observaciones microscópicas se realizaron bajo microscopio óptico (Axiophot, Zeiss, Germany). Las méculas, diámetro de conidios y rugosidad de pared de los conidios se determinaron bajo 1,000x de magnificación. Las fotografías se tomaron utilizando una cámara digital (Digital sight DS-U1, Nikon, Japón) conectada al microscopio óptico.

Todos los aislamientos también se inocularon en agar *Aspergillus flavus parasiticus* (AFPA) para chequear la producción de ácido aspergílico (Pitt *et al.*, 1983).

Los conidios se caracterizaron además utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) (XL series scanning electron microscopic Philips), para lo cual se realizaron suspensiones de conidios en alcohol 50% y se montaron en placas metálicas para su deshidratación (Romero, 1994).

### 3. Análisis de extrolitos en cultivo

El método extracción de extrolitos utilizado fue el descrito por Frisvad y Thrane (1987) con modificaciones de Smedsgaard (1997) para *screening* estandarizado de producción de extrolitos (metabolitos secundarios) en cultivos.

Los aislamientos se cultivaron en cajas de Petri de 90mm de diámetro conteniendo CYA, YES, MEA y OA en cámara de cultivo a 25°C en oscuridad. Al cabo de 10 días se tomaron con sacabocado estéril 3 *plugs* de 6mm de diámetro de una de las colonias de las 3 que crecían por caja de Petri (aprox. 85mm<sup>2</sup> de superficie). Los *plugs* se tomaron de la siguiente forma: uno en el centro de la colonia, uno en el extremo de la colonia mas alejado

de las otras colonias de la caja y uno cercano al punto de contacto con la otra colonia para representar la variabilidad de la colonia.

Los 12 *plugs* obtenidos para cada una de las cepas se colocaron en viales con tapa, agregando 500µl de metanol-diclorometano-acetato de etilo (1:2:3) conteniendo 1% (v/v) de ácido fórmico como solvente. Los viales se llevaron a ultrasonicador durante 60 minutos. El extracto obtenido luego de este proceso se transfirió a viales limpios utilizando una pipeta Pasteur, luego los viales conteniendo la fase orgánica se colocaron bajo campana hasta lograr la sequedad.

Los residuos obtenidos se redisolviéron en 400µl de metanol conteniendo 0.6% (v/v) de ácido fórmico, 0.02% (v/v) de ácido clorídrico y 2.5% (v/v) de agua y se llevaron a ultrasonicador por 10 minutos. La evaporación del solvente de extracción y redisolución se llevaron a cabo para remover el etilacetato que es incompatible para la inyección en la fase móvil de Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizada.

Todas las muestras se filtraron a través de filtros Minisart RC4 (Sartorius, Germany) de 0.45µm de poro y se colocaron en viales para el análisis.

El análisis de producción de extrolitos se realizó en un cromatógrafo líquido Agilent HP1100M (Hewlett-Packard, Germany) combinado con un sistema detector de arreglo de diodos (DAD, *diode array detection*) (Waldbronn, Germany) usando inyecciones de 10 µl, colectando aproximadamente 2 espectros de UV por segundo desde 200nm a 600nm con un ancho de banda de 4nm. Las separaciones se realizaron en una columna Cambridge Hypersil BDS-C<sub>18</sub> de 100 x 4 mm (Hewlett-Packard, USA) con partículas de 3µm e incluyendo columna guarda de 4x4mm. La columna se mantuvo a 40°C. El análisis se realizó con una tasa de flujo de 1ml/ minuto con un gradiente de agua-acetonitrilo comenzando con 85% agua y 15% de acetonitrilo llegando al 100% de acetonitrilo en 40 minutos y manteniéndose en esta condición por 3 minutos para luego retornar a las condiciones iniciales en 8 minutos y equilibrando por 5 minutos. A ambos eluyentes se les agregó 0.005% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA).

Todos los compuestos químicos utilizados fueron productos Merck con grado analítico. Se empleó agua doblemente destilada.

## 4. Análisis filogenético

### 4.1 Extracción y cuantificación del ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico total de cada cepa de *Aspergillus* se realizaron cultivos en medio sólido MEA (anexo pag. I) de aquellas cepas que presentaban poca producción de esclerocios, mientras que las cepas productoras de alto número de estas estructuras de resistencia se cultivaron en Malta Peptona (MP) usando 10% (v/v) de extracto de malta (Brix 10) y 0.1% (p/v) de bactopectona (Difco) en 2ml de medio en tubos de 15ml, la incubación fue de 7 días a 25°C. Para purificar y extraer el ADN total se utilizó el UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories inc., Solana Beach, USA) siguiendo el protocolo de los fabricantes.

La cuantificación y verificación de la integridad del ADN extraído fueron realizadas por electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando el colorante bis-benzimidazol y un marcador de masa conocida para comparar; en todos los casos el ADN migró como una banda única con un tamaño mayor a 20000 pbs. Los geles se analizaron por exposición a un transiluminador de luz ultravioleta. El ADN se guardó en heladera a -20°C hasta su utilización.

### 4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

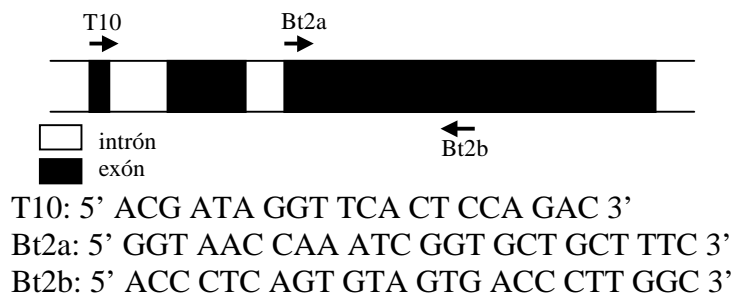
Parte del gen de  $\beta$ -tubulina fue amplificado utilizando los cebadores (*primers*) Bt-T10 (5'-ACGATAGGTTACCTCCAGAC) o Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTT TC) y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass & Donaldson, 1995). El lugar en donde cada uno de estos cebadores hibrida con el ADN esta indicado en la Fig. 4.1. El tamaño aproximado de los productos de amplificación fueron de  $\pm 600$  pares de bases (pb). las reacciones se llevaron a cabo en 25 $\mu$ l totales, conteniendo 1 $\mu$ l del ADN genómico (10 ng/ $\mu$ l), 0.75 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM, BioTaq), 2.5 $\mu$ l buffer con 10xNH<sub>4</sub> (BioTaq), 17.8 $\mu$ l agua estéril ultra pura, 1.85 $\mu$ l dNTP (1mM), 0.5 $\mu$ l de cada cebador (10nmol/ $\mu$ l) y 0.1 $\mu$ l enzima Taq (5U/ $\mu$ l, Biotaq™ DNA Polymerase, Bionline Rnadloph, USA).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (AB Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d Yssel, The Netherlands) programado para una

incubación inicial de 5 minutos a 94°C para activar la enzima polimerasa, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, y 1 minuto a 72°C. Se incubó al final a 72°C durante 7 minutos para la extensión de las cadenas que pudieran haber quedado incompletas.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH: 8) y revelados por tinción con 0.5µg/ml de bromuro de etidio, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los geles se analizaron por exposición a un transiluminador de luz ultravioleta.

**Fig. 4.1.** Ubicación de los cebadores que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificar la región del gen  $\beta$ -tubulina .



### 4.3 Secuenciación de ADN

#### 4.3.1 Preparación y cuantificación de los templados

Los productos de PCR se purificaron utilizando una columna comercial GFX, PCR DNA Purificación kit (Amersham Bioscience, Roosendaal, The Netherlands) siguiendo el protocolo especificado por los fabricantes. La concentración de los productos amplificados fue estimada por electroforesis en gel de agarosa 1,5% utilizando el colorante bis-benzimidazol y un marcador de masa conocida para comparar. Los fragmentos de PCR purificados se resuspendieron en 50µl de buffer TAE fueron secuenciados directamente (White *et al.*, 1990).

#### 4.3.2 Reacción de secuenciación

Se secuenciaron ambas cadenas de ADN utilizando los cebadores de amplificación correspondientes (Fig. 4.1). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando

el kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience, Roosendaal, The Netherlands).

Las reacciones de secuenciación se realizaron en 10 $\mu$ l totales, conteniendo 1 $\mu$ l del templado de ADN (10-15 ng/ $\mu$ l), 4 $\mu$ l Dye terminator RR mix, 4 $\mu$ l agua estéril ultra pura y 1 $\mu$ l del cebador Bt2a o Bt-T10 o Bt2b (4 $\mu$ mol/ $\mu$ l). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (AB Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d Yssel, The Netherlands); programado con 30 ciclos de: 1 minuto a 95°C, 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 50°C y una reacción de extensión final de 4 minutos a 60°C.

Los productos de secuenciación se purificaron con una columna superfina Sephadex G-50 (Amersham Bioscience, Roosendaal, The Netherlands) en una placa *multiscreen* HV Millipore (Amsterdam, The Netherlands) y con una placa de reacción MicroAmp Optical 96-well (Amersham Bioscience, Roosendaal, The Netherlands). Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron en un secuenciador automático ABI Prism 3700 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d Yssel, The Netherlands) y las secuencias obtenidas se analizaron usando CEQ2000 DNA Analysis Software.

Utilizando las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de los distintos cebadores de la amplificación de cada copia se generaron secuencias consenso creadas por medio de los programas Seqman y Editseq del lasergene package (DNASStar Inc., Madison, WI).

#### **4.3.3 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético**

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa BioNumerics de Applied Maths. En el caso de presentarse ambigüedades en el alineamiento resultante, las mismas fueron chequeadas a ojo y corregidas.

Las distancias genéticas entre secuencias y la composición de bases se calcularon utilizando el programa PAUP\* 4.0 beta10 (Swofford, 2000). Los *gaps* se trataron como 50% del estado del carácter y los caracteres sin información fueron excluidos. La construcción de árboles filogenéticos de Máxima Parsimonia (MP) fue realizada con una matriz de caracteres no pesados ni ordenados. Se realizó una búsqueda heurística de 10 réplicas con orden de adición de las secuencias aleatoria. El soporte de cada clado se realizó por medio del análisis de *bootstrap* con 1000 réplicas (Hillis & Bull, 1993).

Otros parametros incluyendo longitud del árbol, índice de consistencia, índice de retención e índice de consistencia reescalado (CI, RI y RC, respectivamente) también

fueron obtenidos ya que los programas de parsimonia utilizan estas medidas como estándares para evaluar la ‘calidad’ de los cladogramas. La longitud es el número mínimo de cambios en los estados de los caracteres (pasos) requeridos en un cladograma para dar cuenta de los datos. El largo en el árbol de consenso provee información sobre la existencia de conflicto de caracteres entre (y no dentro) de los cladogramas. El índice de consistencia (CI) (Kluge & Farris, 1969) es una medida de la cantidad de homoplasia presente en una matriz de datos relativa a un cierto árbol. El índice de retención (RI) (Farris, 1989) es la fracción de posible homoplasia retenida como sinapomorfía en el árbol.

Las secuencias se depositaron en el GenBank: <http://www.nlm.nih.gov/GenBank>.

#### **4.4 Elección de grupo externo**

De acuerdo a Nixon y Carpenter, (1993), cuanto mayor sea el número de taxones en el grupo externo, mejor fundada estará la inferencia filogenética. Aunque no es necesaria la presencia en el análisis de más de un taxón para determinar la raíz del árbol, si lo es para poner a prueba la monofilia del grupo de estudio.

Los análisis filogenéticos en la sección *Flavi* a partir de secuencias de  $\beta$ -tubulina, (Varga *et al.*, 2003; Frisvad *et al.*, 2005) guiaron la selección del taxón que conforma el grupo externo de la matriz de  $\beta$ -tubulina, eligiéndose a *A. niger* como representante. La secuencia parcial del gen de  $\beta$ -tubulina de *A. niger* (CBS 120.49) se obtuvo del banco de datos de secuencias GenBank, <http://www.nlm.nih.gov/GenBank>.

## **RESULTADOS**

### **1. Caracterización morfológica**

Todos los aislamientos de *Aspergillus* analizados por examinación microscópica exhibieron cabezuelas conidiales en tonos verdosos-amarillentos a castaños, y mostraron colonias similares en todos los medios utilizados en este estudio, creciendo todas muy rápido y alcanzando a completar el diámetro de la caja a 25° y 37°C antes de los 7 días. Estas características morfológicas están típicamente asociadas con la sección *Flavi* (Raper y Fennell, 1965).

Con la excepción de *A. terricola* var. *americanus* (CBS 580.65, CBS 119.51) (Fig. 4.5.A), *A. leporis* (CBS151.66, CBS349.81), *A. parasiticus* II (M7H3, M7H4, M8H1, M8H2, M8H4, M8H5) (Fig. 4.6.A), *A. nomius* (CBS 260.88), *A. bombycis* (CBS 117.187), *A. zhaoqingensis* (CBS399.93) (Fig. 4.7.A), *A. tamarisii* (CBS 104.13, CBS 104.14, T3N21), *A. flavofurcatus* (CBS 484.65), *A. pseudotamarisii* (CBS 766.97, CBS 765.97, CBS 117625, CBS 117628) y *A. caelatus* (CBS 763.97; CBS 764.97, M13H3) (Fig. 4.8.A) el resto de los aislamientos presentaron una coloración naranja en el reverso de las cajas de AFPA.

Dentro de la sección *Flavi*, *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. tamarisii*, *A. pseudotamarisii*, *A. caelatus* y *A. leporis* son especies capaces de producir esclerocios. Catorce de los aislamientos de *A. flavus* utilizados resultaron ser productores de esclerocios tipo S, dos de ellos (CBS 121.62, CBS 117732) fueron caracterizados por Frisvad *et al.* (2005) como *A. parvisclerotigenus* y los 12 restantes de Argentina caracterizados como *A. flavus* “atípicos” (M22N3, M32N4, M35N2, M40N1, LLF39, LLF37, T1N20, T1N21, T4N18, T4N32, T4N33, T4N34) podrían ser incluidos dentro de esta especie ya que las observaciones macro y microscopias mostraron muchas similitudes (Fig. 4.3.C, 4.3.H).

Como la mayoría de las cepas pertenecientes al subgénero *Circumdati*, los aislamientos utilizados en este estudio presentan alta proporción de mótulas llevando fiálides que cubren gran parte de la vesícula. El tamaño de los conidios es muy similar entre los aislamientos y la rugosidad y ornamentación difieren entre grandes grupos, siendo los conidios equinulados de *A. tamarisii*, *A. pseudotamarisii* y *A. caelatus* los que presentaron una ornamentación mas conspicua (Fig. 4.8.E, 4.8.N, 4.8.Q; Fig. 4.9.H, I, J). Los conidios de los aislamientos de *A. flavus* “atípicos” de Argentina, fueron los más pequeños y lisos de todos los aislamientos observados (Fig. 4.3.J; Fig. 4.9.C). La Figura 4.9 muestra los conidios de distintas especies de la sección donde puede observarse la ornamentación característica de cada una. Los resultados de las observaciones morfológicas para los aislamientos de *A. parasiticus* II, coincidieron con los de la Sección 1, presentando características similares a *A. caelatus*, *A. parasiticus* y *A. flavus*. Pero al comparar estos aislamientos con la descripción de los aislamientos “tipo 0” de Feibelman *et al.* (1998) y con las características observadas en este estudio para la cepa FP-1 (CBS 108.30) de

Kumeda *et al.* (2003), *A. parasiticus* II presenta características representativas de estos 2 grupos (Fig. 4.6; Fig. 4.9.F).

Las cepas del CBS utilizadas como representantes de todas las especies de la sección *Flavi* (Tabla 4.2) presentaron morfologías típicas descriptas para las distintas especies dentro de las cuales fueron incluidas (Raper & Fennell, 1965; Kurtzman, 1987; Kozakiewicz, 1989; Horn, 1997; Peterson *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001). De las 26 cepas de Argentina analizadas, 15 pudieron ubicarse dentro de especies de la sección *Flavi* mediante la observación de características morfológicas, y las 11 restantes no pudieron incluirse dentro de ninguna especie establecida con anterioridad.

Como resultado de las observaciones morfológicas podrían definirse 7 grupos basados en características morfológicas similares entre aislamientos (Tabla 4.3): el grupo '*A. flavus*' con las especies *A. subolivaceus*, *A. oryzae*, *A. leporis* y *A. flavus* (Fig. 4.2; Fig. 4.9.A); '*A. parvisclerotigenus*' que incluye a *A. flavus* "atípicos" y *A. parvisclerotigenus* como integrantes (Fig. 4.3; Fig. 4.9.B, C); el grupo '*A. parasiticus*' con las especies *A. sojae*, *A. toxicarius* y *A. parasiticus* (Fig. 4.4; Fig. 4.9.D, E); el grupo '*A. terricola* var. *americanus*' (Fig. 4.5); '*A. parasiticus* II' (Fig. 4.6; Fig. 4.9.F); '*A. nomius*' con *A. zhaoqingensis*, *A. bombycis* y *A. nomius* como integrantes (Fig. 4.7; Fig. 4.9.G); el grupo '*A. tamaritii*' que incluye a las especies *A. flavofurcatus*, *A. thomii*, *A. pseudotamaritii*, *A. caelatus* y *A. tamaritii* (Fig. 4.8; Fig. 4.9.H, I, J). Resulta muy difícil separar a las especies de la sección *Flavi* en grupos por sus características morfológicas, debido a la gran superposición de caracteres entre las especies, ya que todas las especies del grupo presentan características macro y micromorfológicas muy similares



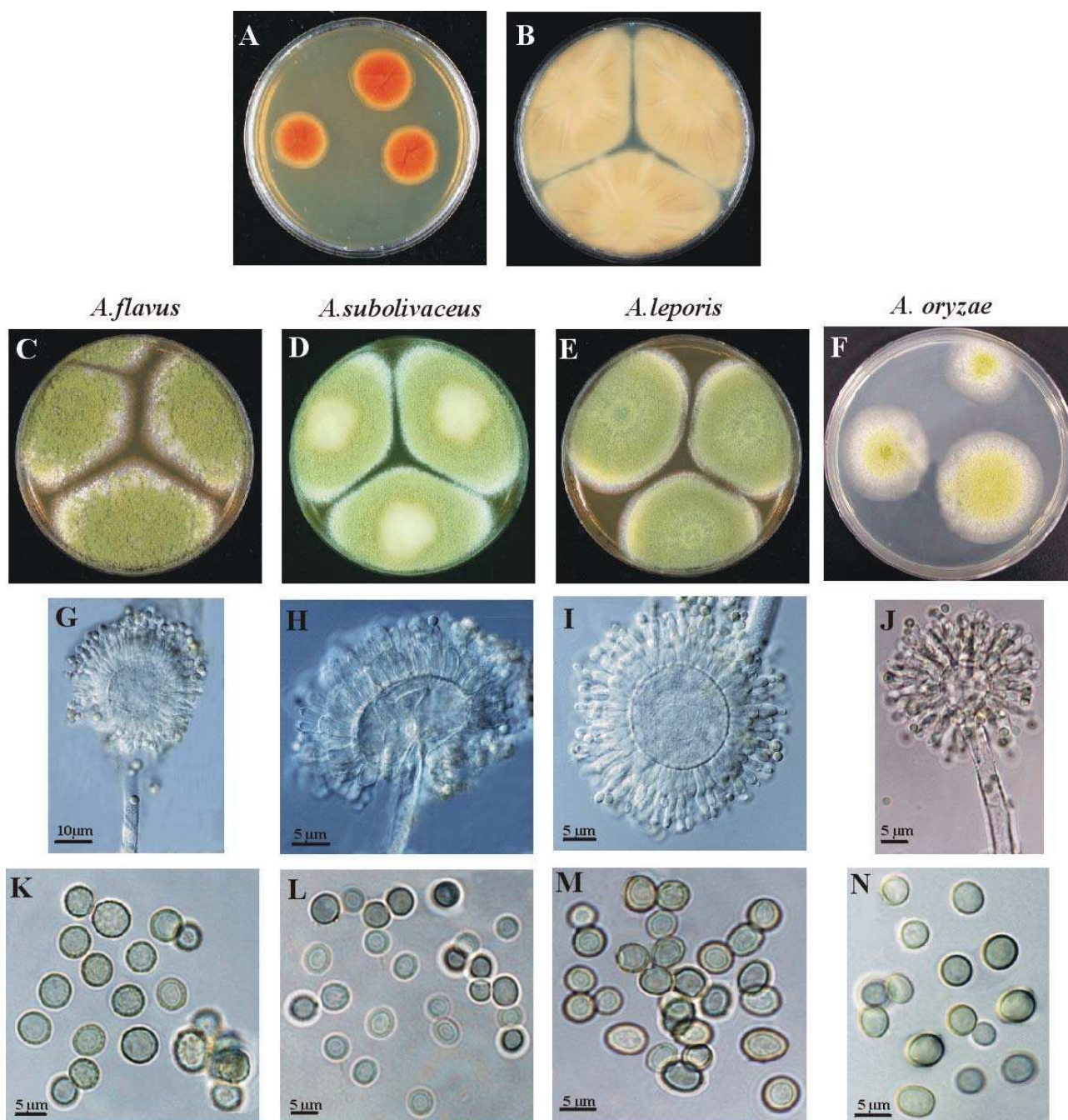
**Tabla 4.3.** Caracterización de grupos morfológicos de la sección *Flavi*.

Grupos	Características macroscópicas <sup>a</sup>			Características microscópicas <sup>a</sup>				
	AFPA <sup>b</sup>	Colonia <sup>c</sup>	esclerocios	estipite	Vesícula	metulas	fialides	conidios
<i>A. flavus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. subolivaceus</i> , <i>A. leporis</i> , <i>A. oryzae</i> )	+ (excepto <i>A. leporis</i> y <i>A.</i> <i>oryzae</i> )	45-70. Verde luminoso, amarillento cuando joven (29-E5); micelio delgado, escaso, flocoso en el centro, alto número de cabezuelas conidiales. Reverso incoloro. Exudados, si presentes, incoloros.	+/- (> 400µm). Tipo L Esféricos- sub-esféricos.	1000µm o +. Pared muy rugosa.	10-65µm globosa- subglobosa	6-10 x 4-5µm	6-10 x 3-5µm	3-6µm globosos a subglobosos, equinulados
<i>A. parvisclerotigenus</i> ( <i>A. parvisclerotigenus</i> , <i>A.</i> <i>flavus</i> "atípicos")	+ / -	45-70. Verde luminoso, amarillento cuando joven (29-E5); micelio flocoso abundante, grisáceo, bajo número de conidios. Reverso castaño, oscuro a los 14 días. Exudados, si presentes, incoloros.	+ (< 400µm). Tipo S Esféricos- sub-esféricos.	1200µm o +. Pared muy rugosa.	20-50µm globosa- subglobosa	11-14 x 3- 5µm	6-10 x 3-5µm	3-4µm elipsoidales, lisos a finamente rugosos
<i>A. parasiticus</i> ( <i>A. parasiticus</i> , <i>A. toxicarius</i> , <i>A. sojae</i> )	+	50-70. Micelio blanco no esporulado cuando joven; cabezuelas verde oscuro- oliváceo, tipo espinaca (3-E7; E29-7). Reverso incoloro. Exudados, si presentes, incoloros.	+/- (>400µm). Esféricos- sub-esféricos.	300-700µm, raramente 1000µm. Pared rugosa.	20-35µm globosa- subglobosa	6-10 x 4-5µm escasas	7-9 x 3-4µm	3.5-5.5µm conspicua- mente equinulados
<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	-	50-70. Amarillo ocre a castaño luminoso (5-B3; 5-D5). Reverso incoloro, sin exudados	-	300-700µm, Pared rugosa.	20-35µm globosa- subglobosa	7-9 x 4-6µm escasas	7-10 x 3-5µm	4.5-5.5µm Elípticos, rugosos
<i>A. parasiticus</i> II	-	50-70. Verde oliváceo-castaño oliváceo (3-E8; 4-E7). Reverso amarillento. Exudados, si presentes, incoloros.	-	400-600µm, raramente 1000µm. Pared rugosa.	28-45µm globosa- subglobosa	9-14 x 5-7µm	7-11 x 3-6µm	4.5-5µm globosos, equinulados
<i>A. nomius</i> ( <i>A. nomius</i> , <i>A.</i> <i>zhaoqingensis</i> , <i>A. bombycis</i> )	-	50-70. Micelio flocoso, castaño claro, pocas cabezuelas conidiales verde luminoso, amarillo oliváceo (2-D8; 29-E4). Reverso caramelo (5-C4). Exudados naranja-castaño claro.	+/- (> 400µm). Cilíndricos, con forma de cañón	300-1100µm, Pared lisa o equinulada.	25-35µm globosa- subglobosa	8-17 x 4-8µm escasas	7-11 x 3-7µm	3.5-8µm globosos a subglobosos, rugosos a equinulados
<i>A. tamarii</i> ( <i>A. tamarii</i> , <i>A. thomii</i> , <i>A.</i> <i>flavofurcatus</i> , <i>A.</i> <i>pseudotamarii</i> , <i>A. caelatus</i> )	- (excepto <i>A. thomii</i> )	50-70. Castaño oliváceo, castaño oro (3-E7; 4-E6; 5-D7). Reverso castaño amarillento (4-C4). Exudados, si presentes, incoloros.	+/- (> 400µm). Esféricos- sub-esféricos.	200-800µm, Pared finamente rugosa.	25-50µm globosa- subglobosa	4-15 x 2-6µm	7-10 x 4-6µm	5-9µm groseramente rugosos con pared gruesa

<sup>a</sup>Las observaciones macro y micromorfológicas se realizaron a los 7 y 14 días de crecimiento. <sup>b</sup>AFPA: agar *Aspergillus Flavus-Parasiticus*.

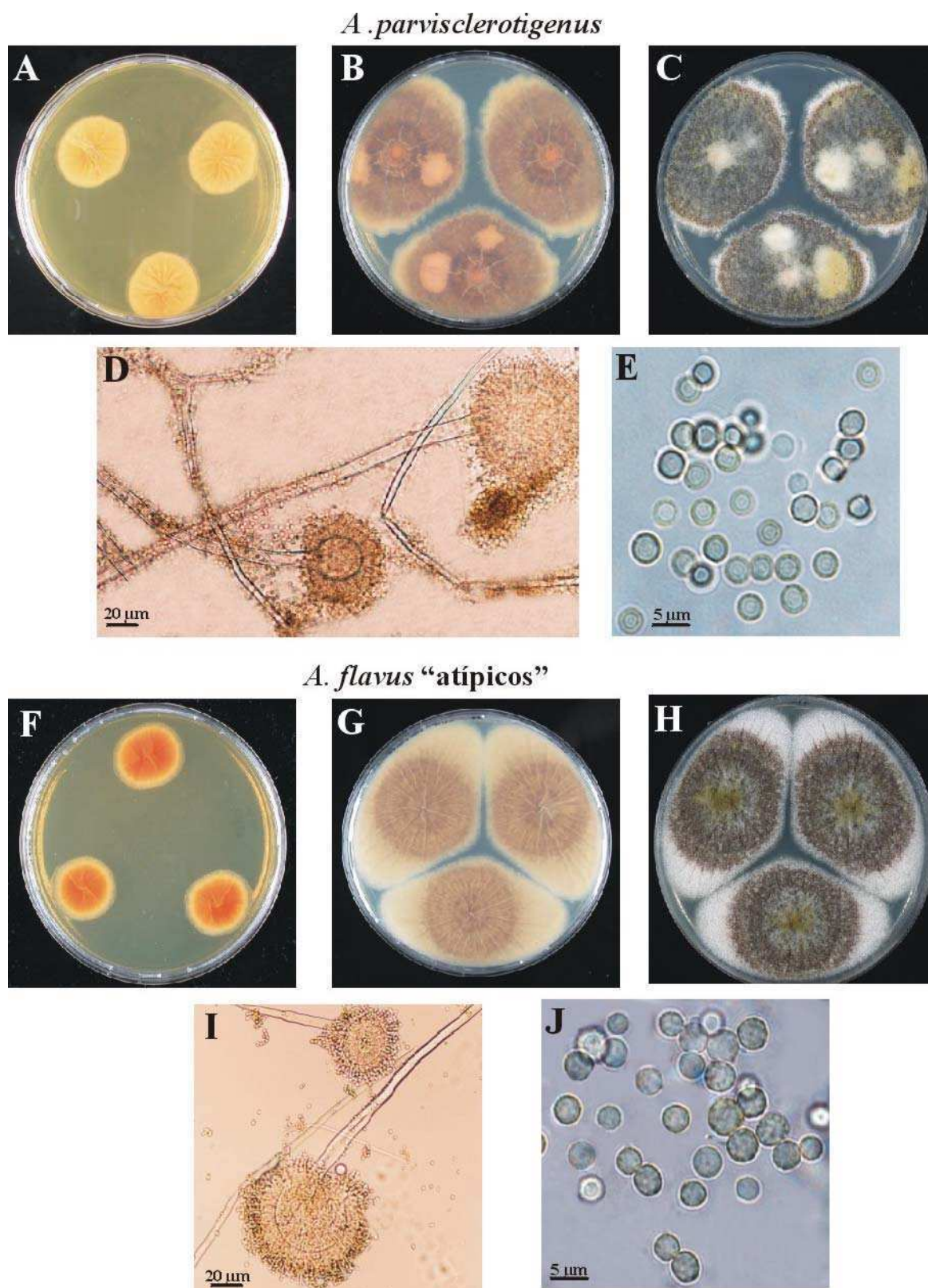
<sup>c</sup>Los diámetros de las colonias (mm) son resultado del promedio de los diámetros en los medios CYA, YES, MEA, OA. Los códigos de color corresponden a Methuen, Handbook of color, 1978).

**Figura 4.2.** Características del grupo morfológico '*A. flavus*'.



**A)** Colonia en AFPA mostrando reacción positiva característica del grupo. **B)** Reverso en CYA, característico de las especies del grupo. **C, G, K)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. flavus*. **D, H, L)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. subolivaceus*. **E, I, M)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. leporis*. **F, J, N)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. oryzae*.

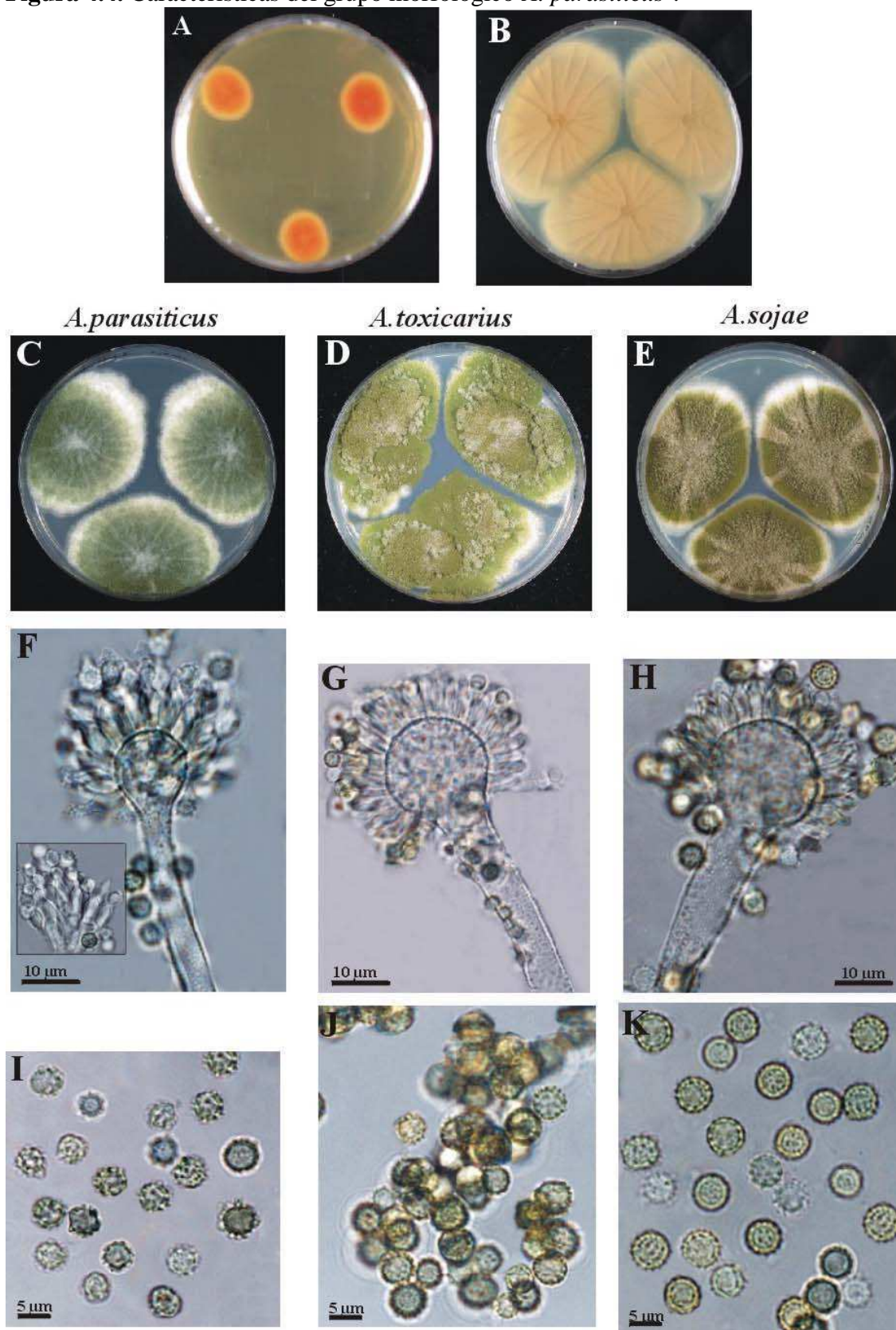
**Figura 4.3.** Características del grupo morfológico '*A. parvisclerotigenus*'.



**A, B, C, D, E)** *A. parvisclerotigenus*: Colonia en AFP, mostrando reacción negativa; Reverso en CYA; Colonia en CYA, cabezuela y conidios. **F, G, H, I, J)** *A. flavus* "atípicos": Colonia en AFP, mostrando reacción positiva; Reverso en CYA; Colonia en CYA, cabezuela y conidios.

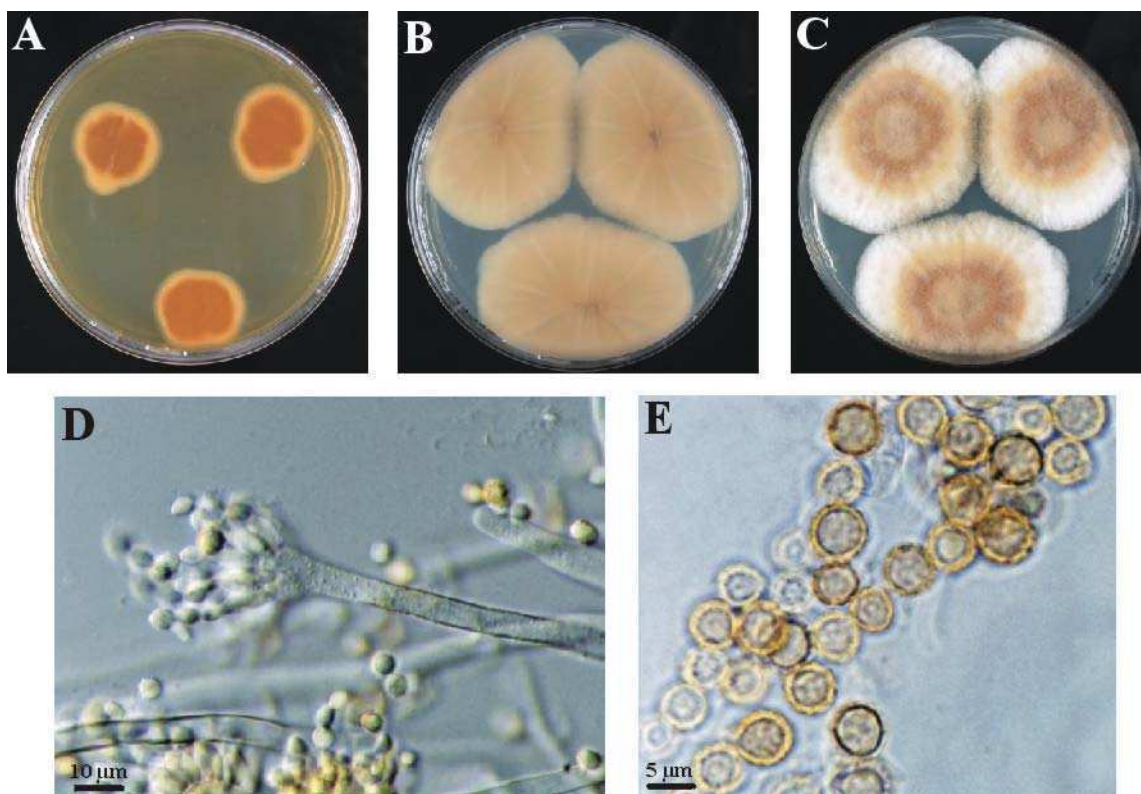


**Figura 4.4.** Características del grupo morfológico '*A. parasiticus*'.



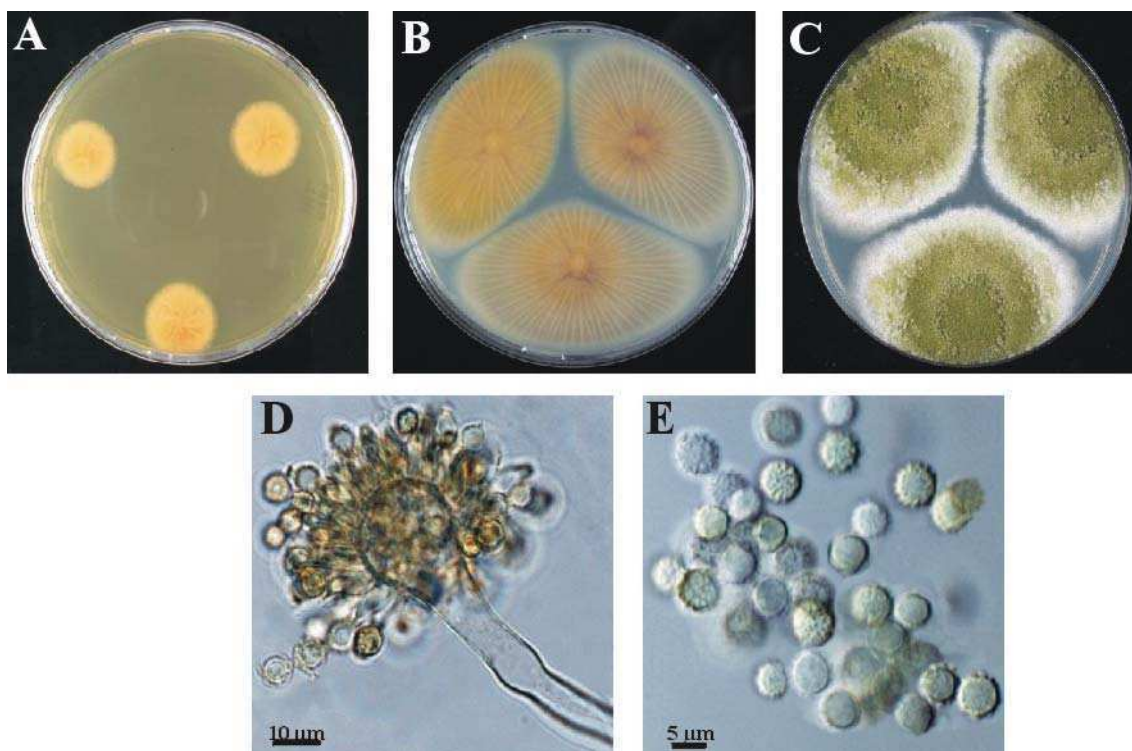
**A)** Colonia en AFPA mostrando reacción positiva característica del grupo. **B)** Reverso en CYA, característico de las especies del grupo. **C, F, I)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. parasiticus*. **D, G, J)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. toxicarius*. **E, H, K)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. sojae*.

**Figura 4.5.** Características del grupo morfológico '*A. terrícola* var. *americanus*'.



**A, B, C, D, E)** *A. terrícola* var. *americanus*: Colonia en AFPA, mostrando reacción negativa; Reverso en CYA; Colonia en CYA, cabezuela y conidios.

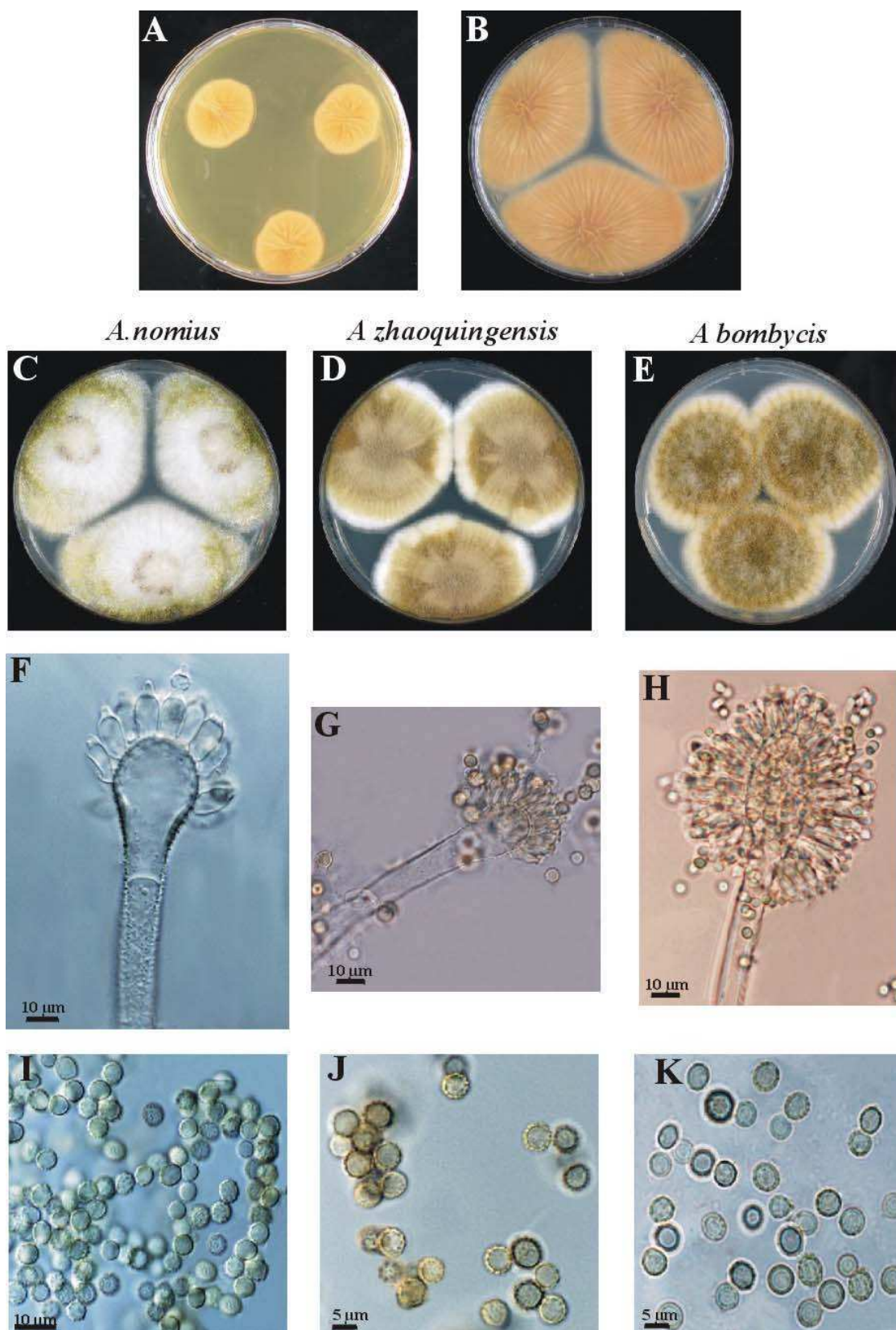
**Figura 4.6.** Características del grupo morfológico '*A. parasiticus* II'.



**A, B, C, D, E)** *A. parasiticus* II: Colonia en AFPA, mostrando reacción negativa; Reverso en CYA; Colonia en CYA, cabezuela y conidios.

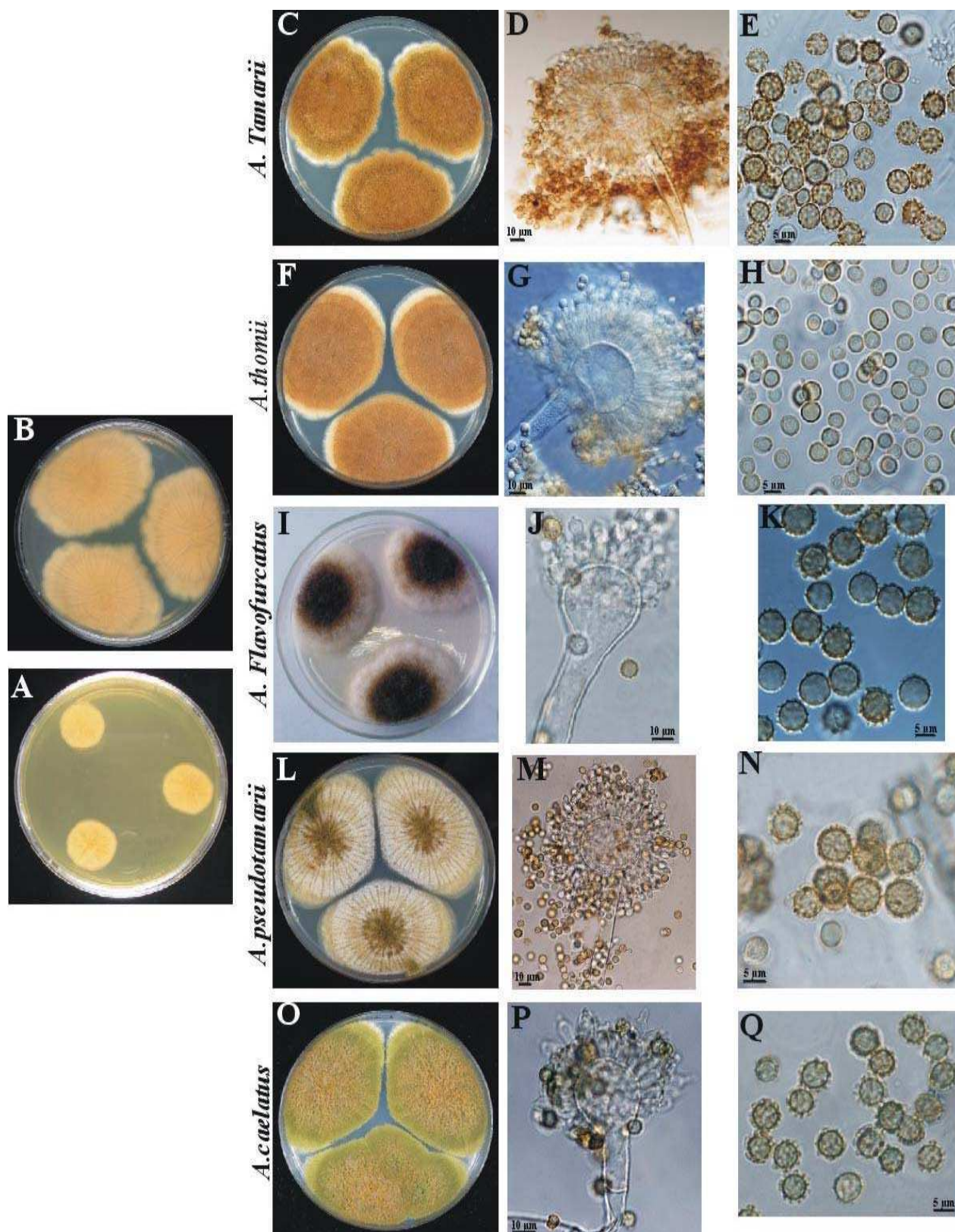


**Figura 4.7.** Características del grupo morfológico '*A. nomius*'.



**A)** Colonia en AFPA mostrando reacción negativa característica del grupo. **B)** Reverso en CYA, característico de las especies del grupo. **C, F, I)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. nomius*. **D, G, J)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. zhaoqingensis*. **E, H, K)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. bombycis*.

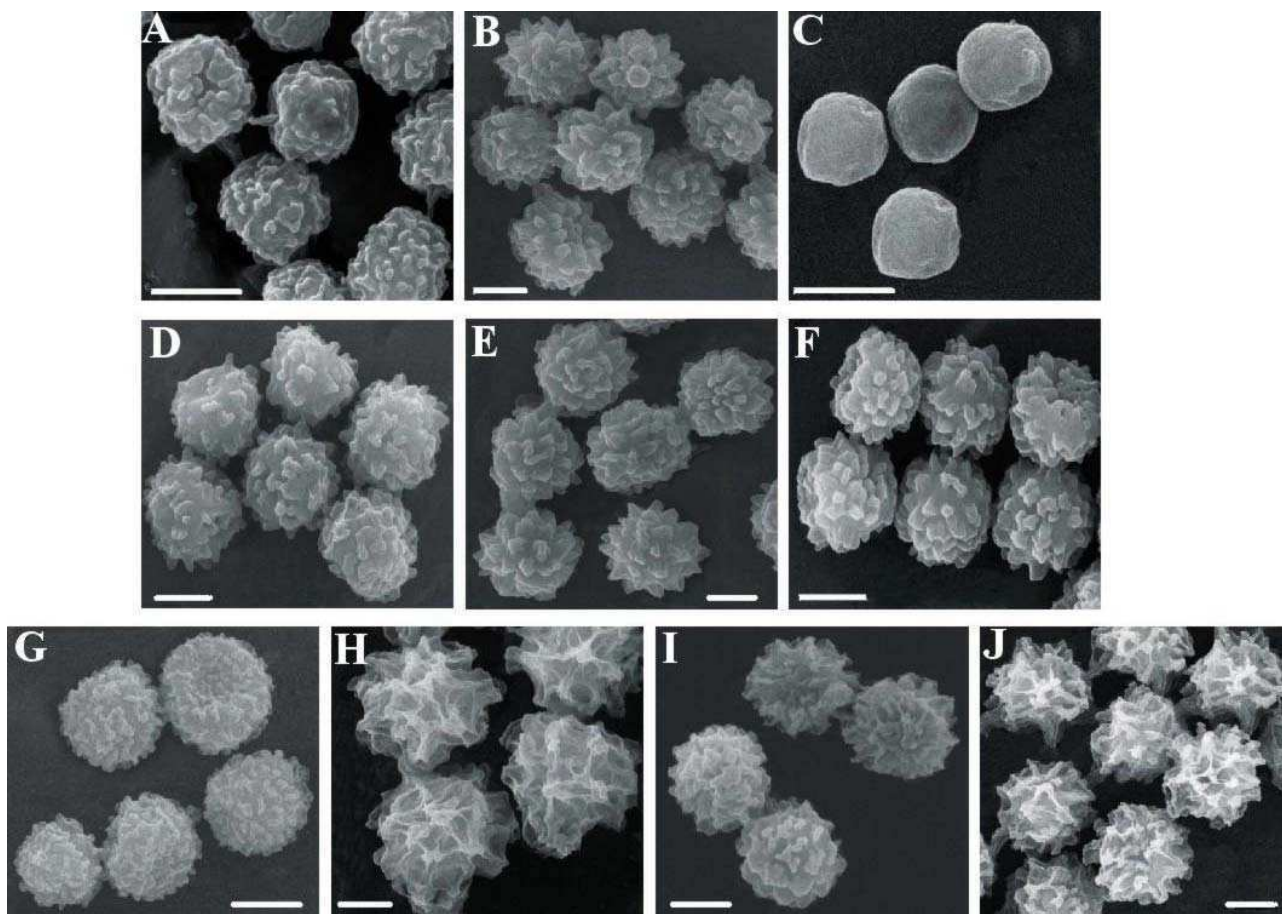
**Figura 4.8.** Características del grupo morfológico '*A. tamaritii*'.



**A)** Colonia en AFPA mostrando reacción negativa característica del grupo. **B)** Reverso en CYA, característico de las especies del grupo. **C, D, E)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. tamaritii*. **F, G, H)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. thomii*. **I, J, K)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. flavofurcatus*. **L, M, N)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. pseudotamaritii*. **O, P, Q)** Colonia en CYA, cabezuela y conidios de *A. caelatus*.



**Figura 4.9.** Conidios de especies de la sección observados a microscopio electrónico (SEM).



**A)** *A. flavus*. **B)** *A. parvisclerotigenus*. **C)** *A. flavus* “atípicos”. **D)** *A. parasiticus*. **E)** *A. toxicarius*. **F)** *A. parasiticus* II. **G)** *A. nomius*. **H)** *A. tamarii*. **I)** *A. pseudotamarii*. **J)** *A. caelatus*. En todos los casos la barra indica 2.5 $\mu$ m.

## 2. Análisis de extrolitos en cultivo

Los 73 aislamientos de *Aspergillus* de la sección *Flavi* analizados producen un alto número de extrolitos, incluyendo varias micotoxinas. En la tabla 4.4 se presenta la distribución de extrolitos, volátiles y compuestos no caracterizados pero con cromóforos conocidos para las especies analizadas de la sección *Flavi* contabilizándose un total de 59 compuestos, de los cuales 22 no están caracterizados e identificados hasta el momento. Muchos extrolitos son particulares para una especie determinada, pero la mayoría son producidos por más de una especie. Los extrolitos más ampliamente distribuidos entre los miembros de la sección *Flavi* fueron ácido kojico, producido por 68 aislamientos, ácido ciclopiazónico (CPA) y aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) producidos por 45 y 44 aislamientos respectivamente y aflatoxinas B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub>(AFG<sub>1</sub>) y G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) producidas por 38, 29 y 27 aislamientos respectivamente. Mientras que 20 aislamientos produjeron oryzaclorina; 18 aislamientos, 3-metil-esterigmatocistina; 16 aislamientos, paspalina y pasapalinina, parasiticólido y



F4 (compuesto no identificado); 15 aislamientos, antraquinona; 12 aislamientos, aflavininas y 11 aislamientos, aflatrem entre los mas frecuentes.

Las especies que menor diversidad de extrolitos presentaron fueron *A. flavus* var. *flavus* (CBS 542.69, *A. kambarensis*), *A. subolivaceus*, *A. terrícola* var. *americanus*, *A. zhaoqingensis*, *A. flavus* var. *columnaris* y *A. caelatus* (CBS763.97).

En la mayoría de los casos la producción de extrolitos es consistente entre aislamientos de una misma especie, por ejemplo, todas las cepas de *A. parasiticus* examinadas producen ácido kójico, aflatoxinas y parasiticólido. Algunos extrolitos, como el ácido kójico, fueron producidos por la mayoría de las especies, mientras que otros, como el aflatrem, sólo fueron producidos por una especie en particular.

**Tabla 4.4.** Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>															
		AK	FL	FL <sub>1</sub>	FL <sub>2</sub>	CPA	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	Och	I751	I964	I972	I1082	I1055	I1194
M34N2 = CBS 117623	<i>A. flavus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M12N1 = CBS 117622	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M6N1 = CBS 117630	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M29N3 = CBS 117621	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M36N1	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M15N3	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LLF1	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LLF3	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LLF5 = CBS 117632	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LLF8	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF13	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LLF14	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF17	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LLF18	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
T3N6 = CBS 117631	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
T3N9	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N24	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
T4N6	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N29	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BV1	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BV2	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM1	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLP1	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLP2	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9H4	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EH1	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12H2	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M12H5 = CBS 117624	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN1	<i>A. flavus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN2	<i>A. flavus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M22N3 = CBS 115635 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M32N4 = CBS 117634	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
M35N2	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M40N1 = CBS 117639	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LLF37 = CBS 117636	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LLF39 = CBS 117633	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T1N20 = CBS 117620	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T1N21	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>AK: *ác. kójico*; FL: *flavimina*; CPA: *ác. ciclopiazónico*; AFB-G: *aflatoxinas*; Och: *oryzaclorina*; I751-1606: *indoles*

**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>															
		AK	FL	FL <sub>1</sub>	FL <sub>2</sub>	CPA	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	Och	I751	I964	I972	I1082	I1055	I1194
T4N18	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T4N32	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T4N33 = CBS 117637	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
T4N34	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ESC1 = CBS 117638	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC2	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ESN3 = CBS 117619	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
M2H5 = CBS 117617	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M9H3 = CBS 117618	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M7H3 = CBS 117610 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> II	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M7H4 = CBS 117611	<i>A. parasiticus</i> II	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M8H1 = CBS 117612	<i>A. parasiticus</i> II	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M8H2	<i>A. parasiticus</i> II	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
M8H4	<i>A. parasiticus</i> II	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
M8H5 = CBS 117615	<i>A. parasiticus</i> II	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T3N21 = CBS 117626	<i>A. tamarii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M13H3 = CBS 117616	<i>A. caelatus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100927 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 117733	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
CBS 542.69	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CBS 485.65 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 501.65 <sup>T</sup>	<i>A. subolivaceus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 120.51 <sup>T</sup>	<i>A. thomii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100925 <sup>T</sup>	<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
CBS 121.62 <sup>T</sup>	<i>A. parvisclerotigenus</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100926 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
CBS 260.67 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> var. <i>globosus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CBS 822.72 <sup>T</sup>	<i>A. toxicarius</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CBS 580.65 <sup>T</sup>	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 260.88 <sup>T</sup>	<i>A. nomius</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
CBS 117187 <sup>T</sup>	<i>A. bombycis</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 399.93 <sup>T</sup>	<i>A. zhaoqingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CBS 104.13 <sup>T</sup>	<i>A. tamarii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CBS 766.97 <sup>T</sup>	<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 763.97 <sup>T</sup>	<i>A. caelatus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>AK: *ác. kójico*; FL: *flavimina*; CPA: *ác. ciclopiazónico*; AFB-G: *aflatoxinas*; Och: *oryzaclorina*; I751-1606: *indoles*

**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>													
		II655	AQ842	AQ843	AQ1099	NO	NB	E927	E963	E1017	E1018	E1045	E1046	E1155	E1156
M34N2 = CBS 117623	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12N1 = CBS 117622	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M6N1 = CBS 117630	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M29N3 = CBS 117621	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M36N1	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M15N3	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF1	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF3	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF5 = CBS 117632	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF8	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF13	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF14	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF17	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF18	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N6 = CBS 117631	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N9	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N24	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N6	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N29	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BV1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BV2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLP1	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SLP2	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9H4	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EH1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12H2	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
M12H5 = CBS 117624	<i>A. flavus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN2	<i>A. flavus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M22N3 = CBS 115635 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M32N4 = CBS 117634	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M35N2	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M40N1 = CBS 117639	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF37 = CBS 117636	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF39 = CBS 117633	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1N20 = CBS 117620	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1N21	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> II655: indol; AQ: antraquinonas; NO, NB: estructura desconocida .(ED); E927-1156: ED

**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>													
		I1655	AQ842	AQ843	AQ1099	NO	NB	E927	E963	E1017	E1018	E1045	E1046	E1155	E1156
T4N18	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N32	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N33 = CBS 117637	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N34	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC1 = CBS 117638	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC2	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN3 = CBS 117619	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2H5 = CBS 117617	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M9H3 = CBS 117618	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7H3 = CBS 117610 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M7H4 = CBS 117611	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M8H1 = CBS 117612	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M8H2	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M8H4	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M8H5 = CBS 117615	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T3N21 = CBS 117626	<i>A. tamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13H3 = CBS 117616	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100927 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 117733	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 542.69	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 485.65 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
CBS 501.65 <sup>T</sup>	<i>A. subolivaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 120.51 <sup>T</sup>	<i>A. thomii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
CBS 100925 <sup>T</sup>	<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 121.62 <sup>T</sup>	<i>A. parvisclerotigenus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100926 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 260.67 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> var. <i>globosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 822.72 <sup>T</sup>	<i>A. toxicarius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 580.65 <sup>T</sup>	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 260.88 <sup>T</sup>	<i>A. nomius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 117187 <sup>T</sup>	<i>A. bombycis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 399.93 <sup>T</sup>	<i>A. zhaoqingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 104.13 <sup>T</sup>	<i>A. tamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CBS 766.97 <sup>T</sup>	<i>A. pseudotamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 763.97 <sup>T</sup>	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> I1655: indol; AQ: antraquinonas; NO, NB: estructura desconocida .(ED); E927-1156: ED

**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>											
		Asp	Mel659	Alli964	Alli1083	Can743	Rai622	PA	Psp	Kt	3MST	Vcs	Aflv
M34N2 = CBS 117623	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12N1 = CBS 117622	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M6N1 = CBS 117630	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M29N3 = CBS 117621	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M36N1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M15N3	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LLF1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF3	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF5 = CBS 117632	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF8	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LLF13	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF14	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LLF17	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LLF18	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N6 = CBS 117631	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N9	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N24	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N6	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T4N29	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BV1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BV2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SM1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SLP1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SLP2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M9H4	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EH1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M12H2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12H5 = CBS 117624	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M22N3 = CBS 115635 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
M32N4 = CBS 117634	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M35N2	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
M40N1 = CBS 117639	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
LLF37 = CBS 117636	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+-	-	-	+
LLF39 = CBS 117633	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+-	-	-	+
T1N20 = CBS 117620	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
T1N21	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+

<sup>a</sup> Asp: *asperfuran*; Mel, Alli, Can, Rai: *ED*; PA: *parasiticólido*; Psp: *paspalina*, *paspalinina*; Kt: *kontanina*; 3MST: *3-metilesterigmatocistina*; Vcs: *versicolorin*; Aflv: *aflavininas*

**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>											
		Asp	Mel659	Alli964	Alli1083	Can743	Rai622	PA	Psp	Kt	3MST	Vcs	Aflv
T4N18	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
T4N32	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
T4N33 = CBS 117637	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
T4N34	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
ESC1 = CBS 117638	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
ESC2	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ESN3 = CBS 117619	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
M2H5 = CBS 117617	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
M9H3 = CBS 117618	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M7H3 = CBS 117610 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M7H4 = CBS 117611	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M8H1 = CBS 117612	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M8H2	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M8H4	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M8H5 = CBS 117615	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
T3N21 = CBS 117626	<i>A. tamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13H3 = CBS 117616	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100927 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 117733	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CBS 542.69	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 485.65 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
CBS 501.65 <sup>T</sup>	<i>A. subolivaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 120.51 <sup>T</sup>	<i>A. thomii</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100925 <sup>T</sup>	<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 121.62 <sup>T</sup>	<i>A. parvisclerotigenus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CBS 100926 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CBS 260.67 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> var. <i>globosus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
CBS 822.72 <sup>T</sup>	<i>A. toxicarius</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CBS 580.65 <sup>T</sup>	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 260.88 <sup>T</sup>	<i>A. nomius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
CBS 117187 <sup>T</sup>	<i>A. bombycis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 399.93 <sup>T</sup>	<i>A. zhaoqingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 104.13 <sup>T</sup>	<i>A. tamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 766.97 <sup>T</sup>	<i>A. pseudotamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 763.97 <sup>T</sup>	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Asp: asperfuran; Mel, Alli, Can, Rai: ED; PA: parasiticólido; Psp: paspalina, paspalinina; Kt: kontanina; 3MST: 3-metilesterigmatocistina; Vcs: versicolorin; Aflv: aflavininas

**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>															
		Aft	Mel	Alk912	Krn1123	Dhq	Gl	PR768	Mtd787	SCyt	Upso	F4	JoF	Aspi	Fni	Hu	Av
M34N2 = CBS 117623	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
M12N1 = CBS 117622	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
M6N1 = CBS 117630	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
M29N3 = CBS 117621	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
M36N1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M15N3	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LLF1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LLF3	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
LLF5 = CBS 117632	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LLF8	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
LLF13	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
LLF14	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
LLF17	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
LLF18	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
T3N6 = CBS 117631	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
T3N9	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T3N24	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
T4N6	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
T4N29	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
BV1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
BV2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
SM1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
SLP1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
SLP2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
M9H4	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EH1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
M12H2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M12H5 = CBS 117624	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ESN1	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
ESN2	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
M22N3 = CBS 115635 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M32N4 = CBS 117634	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M35N2	<i>A. flavus</i> “atípico”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M40N1 = CBS 117639	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LLF37 = CBS 117636	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LLF39 = CBS 117633	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T1N20 = CBS 117620	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T1N21	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

<sup>a</sup>Aft: aflatrem; Mel: ED; Alk: ED; Krn: ED; Dhq: 2-hidroxi-etil-quinazolina”crisogina”; Gl, PR, MetD, Scyt, Upso, F4, JoF, Aspi, Fni, Hu, Av:ED.



**Tabla 4.4.** (Cont.) Perfil de producción de extrolitos de *Aspergillus* sección *Flavi*

Aislamiento	Especie	Perfil de producción de extrolitos <sup>a</sup>															
		Aft	Mel	Alk912	Krn1123	Dhq	Gl	PR768	Mtd787	Scyt	Upso	F4	JoF	Aspi	Fni	Hu	Av
T4N18	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
T4N32	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
T4N33 = CBS 117637	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4N34	<i>A. flavus</i> “atípico”	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC1 = CBS 117638	<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC2	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESN3 = CBS 117619	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2H5 = CBS 117617	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9H3 = CBS 117618	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7H3 = CBS 117610 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7H4 = CBS 117611	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8H1 = CBS 117612	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8H2	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8H4	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8H5 = CBS 117615	<i>A. parasiticus</i> II	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3N21 = CBS 117626	<i>A. tamaraii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
M13H3 = CBS 117616	<i>A. caelatus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100927 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 117733	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 542.69	<i>A. flavus</i> var. <i>flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 485.65 <sup>T</sup>	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 501.65 <sup>T</sup>	<i>A. subolivaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 120.51 <sup>T</sup>	<i>A. thomii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100925 <sup>T</sup>	<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 121.62 <sup>T</sup>	<i>A. parvisclerotigenus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 100926 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 260.67 <sup>T</sup>	<i>A. parasiticus</i> var. <i>globosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 822.72 <sup>T</sup>	<i>A. toxicarius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 580.65 <sup>T</sup>	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 260.88 <sup>T</sup>	<i>A. nomius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 117187 <sup>T</sup>	<i>A. bombycis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 399.93 <sup>T</sup>	<i>A. zhaoqingensis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 104.13 <sup>T</sup>	<i>A. tamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 766.97 <sup>T</sup>	<i>A. pseudotamaraii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CBS 763.97 <sup>T</sup>	<i>A. caelatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Aft: aflatrem; Mel: ED; Alk: ED; Krn: ED; Dhq: 2-hidroxietil-quinazolina”crisogina”; Gl, PR, MetD, Scyt, Upso, F4, JoF, Aspi, Fni, Hu, Av:ED.

El perfil de producción de extrolitos de cada uno de los aislamientos de las especies de la sección *Flavi* permite diferenciar a las especies entre sí basándose en su potencial toxigénico. Estos resultados se resumen en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Diferenciación de grupos dentro de la sección *Flavi* en base a la producción de extrolitos

Grupo	Producción de extrolitos <sup>a</sup>													
	AK	CPA	FL	AFB	AFG	Och	AQ	PA	Psp	Kt	3MST	Aflv	Aft	Dhq
<i>A. flavus</i>	+	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> “atípico”	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>A. parasiticus</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. parasiticus II</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>A. parvisclerotigenus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. nomius</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>A. zhaoqingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. tamaritii</i>	+	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. pseudotamaritii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. caelatus</i>	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>AK: ácido kójico; CPA: ácido ciclopiazónico; FL: flavimina; AFB: aflatoxina tipo B; AFG: aflatoxina tipo G; Och: oryzaclorina; AQ: antraquinonas; PA: parasiticólido; Psp: paspalina/paspalinina; 3MST: 3-metil-esterigmatocistina; Aflv: aflavininas; Aft: aflatrem; Dhq: 2-hidroxi-etil-quinazolina (crisogina)

Los aislamientos de la variedad *A. flavus* var. *columnaris*, *A. flavus* var. *flavus* y el de la especie *A. subolivaceus* presentaron un perfil de producción de extrolitos similar al de *A. flavus*, mientras que *A. parasiticus* var. *globosus* y *A. toxicarius* resultaron igual que el de *A. parasiticus*, por lo que en base a este tipo de análisis estas variedades y especies estarían incluidas dentro de los grupos *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente.

La extracción de extrolitos reveló además que los aislamientos de *A. flavus* “atípicos” de Argentina producen el mismo perfil que *A. parvisclerotigenus* en cuanto a la producción de aflatoxinas y CPA, no así para la producción de indoles, alfavininas y aflatrem, es por este motivo que quedaron en dos grupos diferentes (*A. flavus* “atípicos” y *A. parvisclerotigenus*, respectivamente). Estos dos grupos se caracterizan por tener un patrón de producción intermedio entre *A. flavus* y *A. parasiticus*, ya que todos ellos producen CPA y aflatoxinas B, como *A. flavus*, y aflatoxinas G, parasiticólido y paspalina/paspalinina como *A. parasiticus*. En las páginas VII - XXXII del anexo están representados los cromatogramas de los aislamientos de las especies *A. flavus* (CBS117632), *A. parasiticus* (CBS117619), *A. flavus* “atípicos” (CBS115635) y *A. parasiticus II* (CBS117610), con el objetivo de ilustrar las diferencias de producción de extrolitos de cada una de estas especies.

El aislamiento M13H3, caracterizado como *A. caelatus*, presentó un perfil de producción de extrolitos diferente al tipo de la especie (CBS 763.97) ya que el aislamiento de Argentina tiene la capacidad de producir CPA y aflatoxinas. Este constituye el primer registro de producción de CPA

y aflatoxinas por parte de *A. caelatus* sensu stricto. Este aislamiento y el CBS763.97 quedaron incluidos dentro del grupo *A. caelatus* por características morfológicas.

*A. nomius* se caracterizó por producir aflatoxinas y 3-metil-esterigmatocistina al mismo tiempo, dando un perfil de producción similar a *A. bombycis*, motivo por el cual ambas especies son incluidas dentro del grupo *A. nomius*. Mientras que *A. pseudotamarii*, conforma un grupo aparte aunque presentó un patrón muy parecido al de *A. flavus*, con la excepción de flaviminas y ácido aspergílico (resultado de placas de AFPA) combinación observada únicamente para los aislamientos de *A. flavus*. El grupo *A. tamarii*, incluye a las especies *A. tamarii* y *A. oryzae*

Los aislamientos caracterizados morfológicamente como *A. parasiticus* II, fueron los únicos capaces de producir 2-hidroxi-etil-quinazolina (crisogina), como también 2 compuestos cuya estructura aun no ha sido caracterizada (NO, E1155), mientras que el resto del perfil de producción es igual al de *A. parasiticus*. *A. flavus* también produjo otro compuesto de estructura desconocida (F4), solo presente en las extracciones de aislamientos de esta especie, es por esto que los aislamientos quedaron en un grupo separado del resto.

La mayoría de los aislamientos de Argentina resultaron incluidos dentro de los grupos *A. flavus* y *A. parasiticus* con excepción de M13H3 y T3N21 que quedaron incluidos dentro de los grupos *A. caelatus* y *A. tamarii* respectivamente. Los aislamientos de Argentina denominados *A. flavus* “atípicos” (M22N3, M32N4, M40N1, LLF39, LLF37, T1N20 y T4N33) y *A. parasiticus* II (M7H3, M7H4, M8H1 y M8H5) conformaron grupos con características propias de producción de extrolitos por lo que no pudieron incluirse dentro de ninguna especie conocida hasta el momento.

De esta manera, del análisis de producción de extrolitos se pueden agrupar a las especies de la sección *Flavi* en 10 grupos (Tabla 4.5): ‘*A. flavus*’, ‘*A. zhaoqingensis*’, ‘*A. parvisclerotigenus*’, ‘*A. flavus* “atípicos”’, ‘*A. parasiticus*’, ‘*A. parasiticus*II’, ‘*A. nomius*’, ‘*A. tamarii*’, ‘*A. pseudotamarii*’ y ‘*A. caelatus*’. Esta asociación entre un determinado perfil de producción de extrolitos y las especies permite hacer inferencias taxonómicas dentro de la sección *Flavi*, pudiendo correlacionarse con los resultados de observaciones morfológicas y filogenéticas.

### 3. Análisis filogenético

La amplificación por PCR de secuencias parciales del gen  $\beta$ -tubulina utilizando los cebadores T10, bt2a y Bt2b (ver Materiales y Métodos Fig. 4.1), dio como resultado productos del tamaño esperado para los aislamientos del género *Aspergillus* (Peterson *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003). Las secuencias variaron en longitud entre 600-650pb, con una longitud de alineamiento de 495- 630pb. Las secuencias generadas a partir del cebador T10 resultaron mas largas que las de

Bt2a, como puede observarse en la Fig. 4.1. El alineamiento resultó en una matriz de 724 caracteres y 69 taxones, De los 724 caracteres, 176 resultaron ser filogenéticamente informativos.

El análisis de MP resultó en 5000 árboles igualmente parsimoniosos de 182 pasos de longitud (CI= 0.846, RI= 0.960, RC= 0.812). En la fig. (Fig. 4.10) se muestra además el árbol de consenso estricto. Se realizaron análisis de *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas para determinar el grado de soporte que brindan los datos a cada uno de los clados que surgen del análisis de MP. La Figura 4.11 muestra uno de los árboles más parsimoniosos y los valores de *bootstrap* obtenidos para el gen  $\beta$ -tubulina.

De la observación de la topología del árbol se desprende que la sección *Flavi* se divide en 3 grandes clados, de los cuales dos encuentran bien resueltos y con un fuerte soporte. Estos clados corresponden a '*A. leporis*' (100% *bootstrap*), '*A. flavus*-*A. parasiticus*' (98%) y '*A. tamarii*' (50%) (Fig. 4.11). Dentro de este último hay 4 clados menores con alto valor de soporte ('*A. caelatus*'; '*A. pseudotamarii*'; '*A. tamarii*'; '*A. nomius* y *A. bombycis*') y 2 de ellos agrupan claramente aislamientos de especies distintas (*A. tamarii* y *A. flavofurcatus*, 100% *bootstrap*; *A. nomius* y *A. zhaoqingensis*, 100% *bootstrap*) (Fig. 4.11).

Dentro del gran clado '*A. flavus*-*A. parasiticus*' las relaciones no están completamente resueltas. Aunque puede observarse 3 clados menores, dos con alto valor de soporte ('*A. flavus*' y '*A. flavus* "atípicos") y otro ('*A. parasiticus*') donde la agrupación de especies no se encuentra respaldada por un buen valor de soporte (51%). Las especies *A. flavus*, *A. thomii*, *A. subolivaceus*, *A. oryzae* y los aislamientos CBS 110.55 y 542.69 ("*A. fasciculatus*" y *A. kambarensis*" respectivamente) se agrupan dentro del clado '*A. flavus*', con un alto valor de soporte (82%) sugiriendo que se encuentran muy relacionadas. No ocurre lo mismo con las especies *A. parasiticus*, *A. toxicarius*, *A. sojae* y *A. terricola* var. *americanus* del clado '*A. parasiticus*' ya que su agrupamiento no está respaldado por un buen valor de soporte (51%). Dentro del clado '*A. parasiticus*' puede observarse claramente los aislamientos denominados como *A. parasiticus* II se encuentran muy relacionados entre sí, con un alto valor de soporte (87%). (Fig. 4.11).

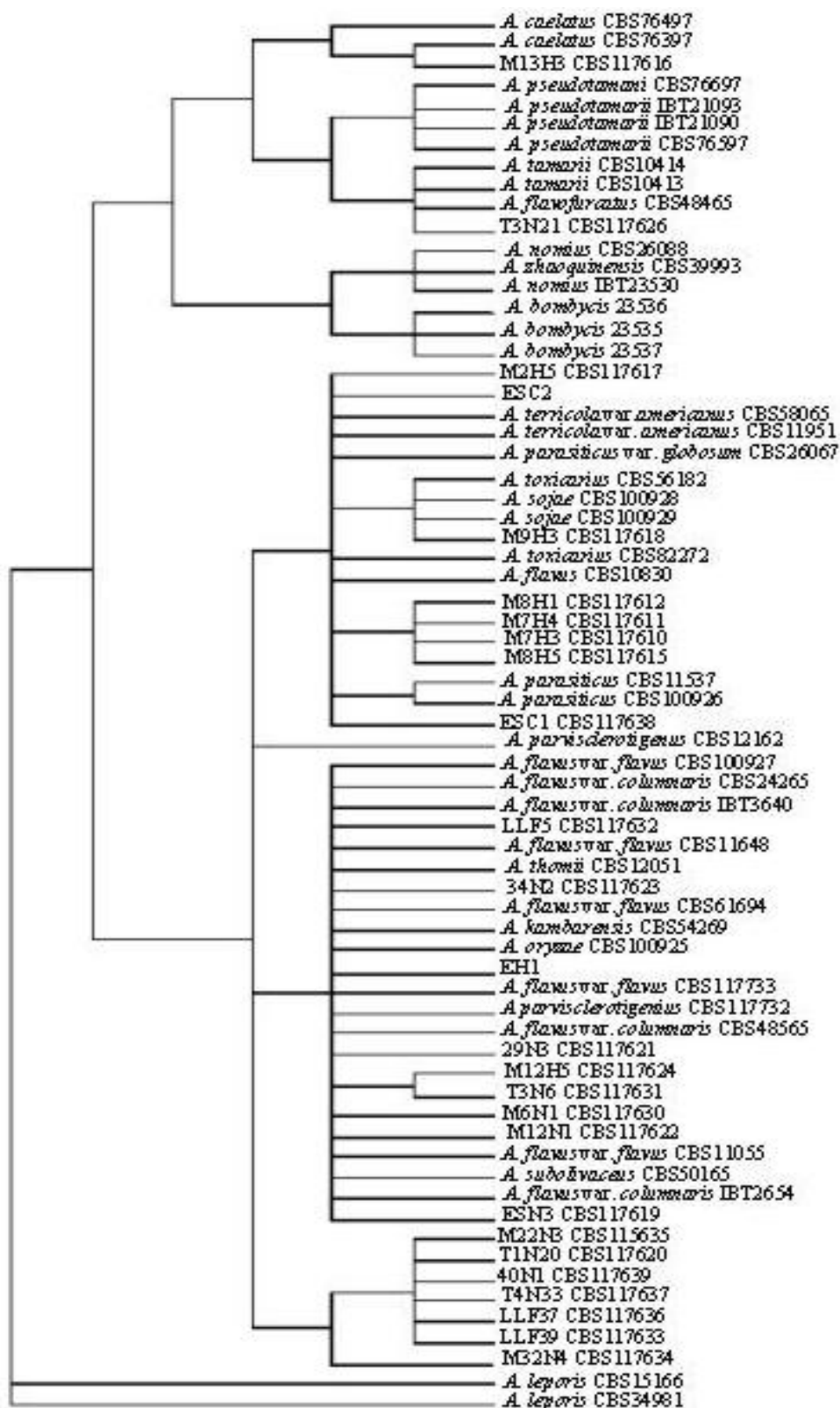
La mayoría de los aislamientos de Argentina resultaron incluidos dentro del principal gran clado ('*A. flavus*-*A. parasiticus*') con excepción de M13H3 y T3N21 que quedaron incluidos dentro de los clados '*A. caelatus*' y '*A. tamarii*' respectivamente. Los aislamientos de Argentina denominados '*A. flavus* "atípicos"' (M22N3, M32N4, M40N1, LLF39, LLF37, T1N20 y T4N33) y '*A. parasiticus* II' (M7H3, M7H4, M8H1 y M8H5) conformaron clados con altos valores de *bootstrap* y se encuentran bien definidos en el árbol consenso, indicando ser grupos claramente monofileticos.

Los resultados de la secuenciación parcial del gen  $\beta$ -tubulina para la especie *A. parvisclerotigenus* no fueron concluyentes ya que los dos aislamientos utilizados (CBS121.62 y 117732) quedaron en clados diferentes. Este resultado no se correlaciona con la caracterización morfológica y toxigénica donde se observa una estrecha relación entre estos dos aislamientos.

Del análisis filogenético se desprende como resultado que la sección *Flavi* cuenta con 10 clados, dos de los cuales tienen un valor de soporte menor o igual al 70% (*A. bombycis*, 70% *bootstrap* y *A. parasiticus* con 51% de *bootstrap*), mientras que los 8 restantes se encuentran respaldados por valores mayores al 85% (*A. caelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *A. nomius*, *A. parasiticusII*, *A. flavus*, *A. flavus* “atipicos”, *A. leporis*) (Fig. 4.11). El árbol de consenso estricto muestra que los 3 grandes clados observados en el árbol más parsimonioso son fuertemente monofileticos, al igual que los clados *A. caelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *A. nomius*, *A. parasiticusII*, *A. flavus* y *A. flavus* “atipicos” (Fig. 4.10).

En la tabla 4.6 puede observarse los grupos en los que se puede dividir a la sección *Flavi* en base a características morfológicas, toxigénicas y moleculares. Esta tabla resume los resultados obtenidos para la Sección 4 de esta tesis.

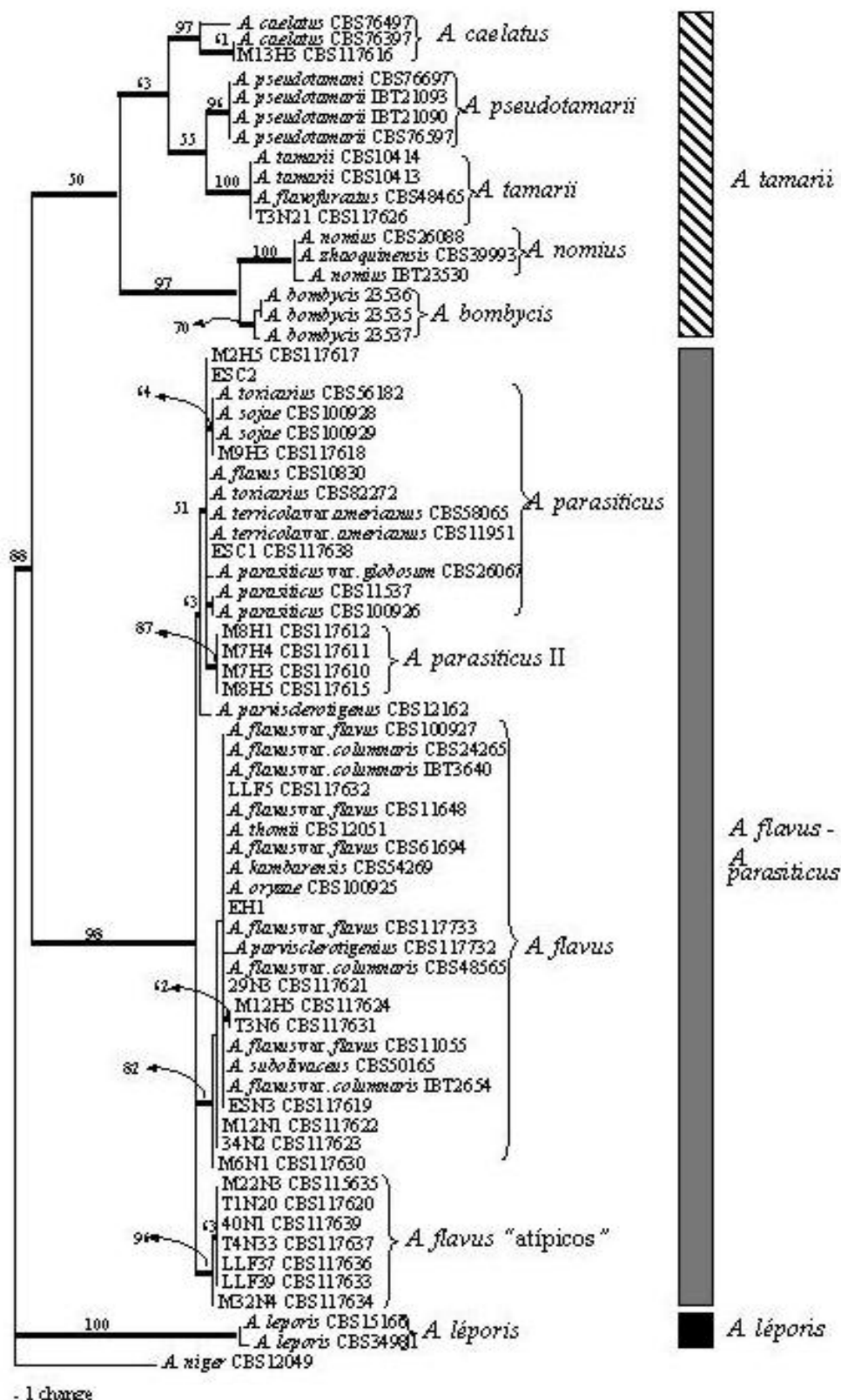
**Fig. 4.10.** Arbol consenso del análisis de MP para *Aspergillus* sección *Flavi* basado en la secuenciación parcial del gen  $\beta$ -tubulina.



\* Designación de los cultivos de *Aspergillus*: el nombre del aislamiento corresponde a la abreviatura del número de muestra seguido por el número del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands) en los casos en que los aislamientos fueran incluidos en esta colección.

\*\*Los valores de *bootstrap*, en porcentaje (>50%) están indicados en las ramas del árbol.

**Fig. 4.11.** Uno de los árboles más parsimoniosos de *Aspergillus* sección *Flavi* basado en la secuenciación parcial del gen  $\beta$ -tubulina.



\* Designación de los cultivos de *Aspergillus*: el nombre del aislamiento corresponde a la abreviatura del número de muestra seguido por el número del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands) en los casos en que los aislamientos fueran incluidos en esta colección.

\*\*Los valores de *bootstrap*, en porcentaje (>50%) están indicados en las ramas del árbol.

**Tabla 4.6.** Agrupamiento de especies de la sección *Flavi* en base a características morfológicas, químicas y moleculares.

Morfológicos		Grupos y especies de la sección <i>Flavi</i>				Moleculares	
Grupo	Especies	Grupo	Químicos		Grupo	Especies	
			<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>			
	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>			<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	
	<i>A. subolivaceus</i>			<i>A. subolivaceus</i>		<i>A. subolivaceus</i>	
	<i>A. leporis</i> *	<i>A. zhaoqingensis</i>		<i>A. zhaoqingensis</i>		<i>A. thomii</i>	
	<i>A. oryzae</i>			<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>		<i>A. oryzae</i>	
				<i>A. thomii</i>			
<i>A. parvisclerotigenus</i>	<i>A. parvisclerotigenus</i>	<i>A. parvisclerotigenus</i>		<i>A. parvisclerotigenus</i>			
	<i>A. flavus</i> “atípicos”	<i>A. flavus</i> “atípicos”		<i>A. flavus</i> “atípicos”	<i>A. flavus</i> “atípicos”	<i>A. flavus</i> “atípicos”	
<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>		<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	
	<i>A. toxicarius</i>			<i>A. toxicarius</i>		<i>A. toxicarius</i>	
	<i>A. sojae</i> *					<i>A. sojae</i>	
<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>					<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	
<i>A. parasiticus</i> II	<i>A. parasiticus</i> II	<i>A. parasiticus</i> II		<i>A. parasiticus</i> II	<i>A. parasiticus</i> II	<i>A. parasiticus</i> II	
<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>		<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	
	<i>A. zhaoqingensis</i>			<i>A. bombycis</i>	<i>A. bombycis</i>	<i>A. zhaoqingensis</i>	
	<i>A. bombycis</i>				<i>A. bombycis</i>	<i>A. bombycis</i>	
<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>		<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>	
	<i>A. flavofurcatus</i> *			<i>A. oryzae</i>		<i>A. flavofurcatus</i>	
	<i>A. thomii</i>						
	<i>A. pseudotamaritii</i>	<i>A. pseudotamaritii</i>		<i>A. pseudotamaritii</i>	<i>A. pseudotamaritii</i>	<i>A. pseudotamaritii</i>	
	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>		<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. caelatus</i>	
					<i>A. leporis</i>	<i>A. leporis</i>	

\* Aislamientos que no pudieron ser utilizados para el análisis de extrolitos debido a que presentaron contaminaciones en al menos uno de los medios de cultivo analizados.



## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio del género *Aspergillus* sección *Flavi* donde se analizan aislamientos procedentes de la Argentina. Además, se contó con los tipos de los taxones utilizados, en este caso de especie, brindando el concepto adecuado de la circunscripción del nombre y permitiendo realizar revisiones nomenclaturales y taxonómicas sumamente necesarias dentro de esta sección, tan importante para la industria alimentaria.

Debido a que la sistemática de la sección *Flavi* presenta inconvenientes por la alta variabilidad del grupo dentro de un contexto morfológico con pocos caracteres y la superposición de morfologías similares entre los individuos, se hace necesario que las descripciones de especies dentro de la sección estén basados en descripciones morfológicas breves y acompañados de estudios moleculares y fisiológicos que permiten aportar mayor riqueza a la descripción.

El análisis del perfil de producción de extrolitos aportó información muy valiosa ya que además de la observación de metabolitos conocidos, se comprobó la producción de muchos otros, con cromóforos característicos, para los cuales no se conoce su estructura y función, dando nuevas perspectivas para llevar a cabo otros estudios más completos. El cultivo de los aislamientos en 4 medios distintos, para la producción de extrolitos, permite que el aislamiento crezca en diferentes condiciones bióticas y por lo tanto asegurarnos que la mayor cantidad de metabolitos estarán presentes en los extractos analizados. Bode *et al.* (2002) sugirió que el uso de una serie diferente de condiciones bióticas y abióticas garantiza la producción de diversos metabolitos.

Los hongos son una fuente rica de diversidad química, y junto con los Actinomycetes producen más del 50% de los metabolitos utilizados por la industria farmacéutica. Es por este motivo que estos organismos son el objetivo de numerosos programas *high-throughput screening* (HTS) en busca de nuevos productos farmacéuticos y otros componentes bioactivos. Para optimizar los programas HTS es muy importante el conocimiento de los organismos, sus géneros y especies que darán información de su bio y quimiodiversidad, ecología, metabolitos secundarios, medios óptimos para la producción de metabolitos, etc. La utilización de la quimiotaxonomía es una de las técnicas más eficaces en los programas HTS ya que por métodos estandarizados es posible obtener la identidad del organismo y la producción de metabolitos. El ácido kójico es una droga muy importante en la industria farmacéutica para la eliminación de las manchas de piel, oryzaclorina y asperfuram son nuevos

antifúngicos, aflatrem es tremorgénico. Estos constituyen algunos ejemplos de los metabolitos producidos por especies de la sección y su utilidad o actividad .

Los aislamientos 34N2, M12H2, ESN1, ESN2 (Tabla 4.2) no produjeron CPA ni aflatoxinas. Considerando que actualmente como técnica de control biológico se utilizan cepas no toxigénicas de *A. flavus* (Cotty *et al.*, 1994; Bock & Cotty, 1999), estas 4 cepas podrían servir de base para formulaciones de biopesticidas en nuestro país.

En este estudio se aplicaron técnicas de biología evolutiva para analizar las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman la sección *Flavi*. Los resultados de la variación genética, a través de la secuenciación de  $\beta$ -tubulina permitieron, además, realizar conexiones entre variación genotípica y fenotípica.

### **1. Correlación de los clados molecularmente definidos, caracterización morfológica y química**

Los resultados de la secuenciación parcial del gen  $\beta$ -tubulina sugieren que la sección *Flavi* podría dividirse en 3 grandes clados (*A. tamarisii*, *A. flavus-A. parasiticus*, *A. leporis*), pero el clado *A. tamarisii* no cuenta con un valor de soporte que justifique la agrupación (50% *bootstrap*) con lo cual los clados menores incluidos dentro de éste grupo no se encontrarían muy relacionados. El gran clado *A. tamarisii* contiene los tipos de *A. tamarisii*, *A. flavofurcatus*, *A. pseudotamarisii*, *A. caelatus*, *A. nomius*, *A. zhaoqingensis*, *A. bombycis*, además de otros aislamientos. Este resultado es congruente con los obtenidos para  $\beta$ -tubulina por Ito *et al.* (2001) y Rigó *et al.* (2002), aunque Peterson *et al.* (2001), secuenciando ITS, obtuvo un valor de soporte muy alto para este grupo. *A. tamarisii*, *A. flavofurcatus*, *A. pseudotamarisii* y *A. caelatus* se caracterizan por poseer conidios conspicuamente ornamentados en tonos oliváceos a castaños aunque el perfil de producción de extrolitos es diferente ya que *A. tamarisii* sólo produce CPA y oryzaclorina mientras que *A. pseudotamarisii* y *A. caelatus* pueden producir aflatoxinas. En este estudio, las secuencias de  $\beta$ -tubulina de *A. tamarisii* y *A. flavofurcatus* resultaron idénticas, al igual que lo obtenido por Peterson (2000) para las secuencias D1-D2 y Kozakiewics (1989) para la morfología de los conidios.

*A. caelatus* fue definida como una especie capaz de producir solo ácido kójico (Horn, 1997), pero el aislamiento M13H3 incluido dentro de esta especie por sus características morfológicas, produce aflatoxinas y CPA. Este resultado sugiere que el genotipo del gen  $\beta$ -tubulina y la habilidad de producir toxinas no estarían asociados.

*A. nomius* conforma un linaje separado de las otras especies productoras de aflatoxinas (*A. flavus* y *A. parasiticus*), se encuentra muy relacionado con *A. zhaoqingensis* y *A. bombycis*, caracterizándose este grupo por producir conidios en tonos verdosos amarillentos y escasamente ornamentados, además *A. nomius* y *A. bombycis* comparten el mismo perfil de producción de extrolitos. Este grupo de taxones se encuentra fuertemente relacionado, apoyado por una buena resolución en el árbol, permitiendo establecer un origen monofilético, lo que concuerda con los resultados de otros estudios anteriores (Peterson *et al.*, 2001; Rigó *et al.*, 2002).

El clado '*A. flavus*' incluye a las especies con mayor importancia económica de la sección *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. sojae*). En base a los resultados obtenidos en este estudio las especies de este gran clado se caracterizan por presentar cabezuelas conidiales en tonos amarillos al principio y verde luminoso cuando maduros, y esclerocios esféricos o subsféricos < o > a 400µm, y dependiendo de la especie la capacidad de producir CPA, aflatoxinas de tipo B y G, paspalina, parasiticólido, aflavininas, aflatrem y crisogina. La misma relación fue previamente sugerida por Peterson (2000) y Rigó *et al.*, (2002) en base a la secuencias de ITS, 5.8S y 26S. Las cepas tipo de *A. flavus* var. *flavus*, *A. oryzae*, *A. subolivaceus* y *A. flavus* var. *columnaris* se encontrarían relacionadas muy cercanamente, esto confirma resultados obtenidos por Nikkuni *et al.* (1998), Peterson (2000) y Rigó *et al.* (2002) quienes utilizaron otros marcadores moleculares para arribar al mismo resultado. Con respecto a *A. thomii*, a diferencia de lo obtenido por Rigó *et al.* (2002), se observa una relación muy estrecha con *A. flavus* (82% *bootstrap*) aunque de acuerdo a las características morfológicas (color de las cabezuelas y tamaño de conidios) es muy similar a *A. tamarii* (Raper & Fennell, 1965) y el perfil de extrolitos lo pone en el mismo grupo que *A. terricola* var. *americanus* debido a que no produce ningún metabolito bajo las condiciones de análisis de este estudio. Por lo tanto con estos datos no se podría arribar a una conclusión dado que los 3 tipos de análisis no resultan congruentes en cuanto a su ubicación taxonómica.

Kurtzman *et al.* (1986) sugirieron que *A. oryzae* y *A. flavus* debían ser consideradas como una única especie. En base a nuestros resultados *A. oryzae*, *A. subolivaceus*, *A. thomii* y *A. flavus* var. *columnaris* podrían ser consideradas variantes morfológicas de *A. flavus*.

Los resultados de las observaciones morfológicas y análisis de extrolitos concentran a las especies *A. parasiticus*, *A. toxicarius* y *A. sojae* en un único grupo ('*A.*

*parasiticus*) caracterizado por la producción de cabezuelas conidiales verde oscuro a oliváceo, esclerocios cuando presentes > a 400µm, y muy constantes en cuanto a la producción de ambos tipos de alfatoxinas, parasiticólido y ausencia de CPA. Al observar el árbol de máxima parsimonia, estas especies estarían formando un clado junto con *A. terricola* var. *americanus* pero con bajo valor de soporte (64% *bootstrap*). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Nikkuni *et al.* (1998) y Rigó *et al.* (2002) en donde *A. parasiticus*, *A. toxicarius* y *A. sojæ* forman un clado con un fuerte soporte y *A. terricola* var. *americanus* forma un clado diferente, aunque relacionado, con *A. thomii*. Las diferencias entre ambos estudios pueden deberse a que la relación entre *A. parasiticus*, *A. toxicarius* y *A. sojæ* con *A. terricola* var. *americanus* no es muy fuerte y esto puede afectar el valor de soporte. Nuevos análisis extrayendo a *A. terricola* var. *americanus* del estudio serían necesarios para esclarecer la relación entre *A. parasiticus*, *A. toxicarius* y *A. sojæ* ya que las características morfológicas y químicas son muy contundentes en cuanto a su similitud. Asimismo, si bien *A. thomii* es morfológicamente más similar a *A. tamarisii*, en el medio de cultivo YES, las cabezuelas toman un color más dorado similar al de *A. terricola* var. *americanus*, el cual presenta conidios muy ornamentados al igual que las otras dos especies (Kozakiewicz, 1989).

Varios estudios sugieren que *A. oryzae* y *A. sojæ* son solamente variantes de *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente (Kurzman *et al.*, 1986; Egel *et al.*, 1994; Feibelman *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 1998; Rigó *et al.*, 2002), indicando que estas especies podrían considerarse variantes “domesticadas” y que no existiría justificación evolutiva para mantenerlas separadas. Sin embargo se ha propuesto que estos taxones se mantengan como especies diferentes debido a la confusión regulatoria que esta coespecificidad podría generar en la industria alimentaria (Geiser *et al.*, 1998).

*A. flavus* “atípicos” y *A. parasiticus* II podrían considerarse como nuevas especies debido al alto valor de soporte que tienen en el análisis filogenético, indicando el aislamiento genético de estos dos clados y dando evidencias de que son especies diferentes a las ya descritas para la sección *Flavi* bajo el concepto filogenético de especie (Taylor *et al.*, 1999). Los resultados del análisis filogenético se complementan con la observación morfológica y el perfil de extrolitos particulares para cada uno de estos grupos, permitiendo sugerir que se trataría de dos especies morfológicas nuevas dentro de la sección. Estas nuevas especies estarían incluidas dentro de los clados ‘*A. flavus*’ y ‘*A. parasiticus*’ respectivamente. Si bien *A. flavus* “atípicos” morfológicamente son muy similares a *A. parvisclerotigenus*, los metabolitos

secundarios y la secuenciación del gen  $\beta$ -tubulina permiten hipotetizar que son dos especies diferentes, con algunas características morfológicas solapadas. *A. flavus* “atípicos” y *A. parvisclerotigenus* podrían ser consideradas especies crípticas ya que morfológicamente son indistinguibles, pero al analizar otros aspectos de su biología como la producción de extrolitos y secuencia de  $\beta$ -tubulina y obtener separación con fuerte soporte quedan establecidas como especies diferentes.

El clado *A. flavus* “atípicos” que contiene a las cepas productoras de esclerocios pequeños (cepas S) y aflatoxinas tipo B y G y CPA como principales características podrían ser referidas también como cepas del grupo II conformado por Geiser *et al.* (1998; 2001), que tendría una posición filogenética intermedia entre *A. flavus* y *A. parasiticus* (Hesseltine *et al.*, 1970). En estos estudios se sostiene la hipótesis de que *A. flavus*, como esta definido en la actualidad, representa un grupo parafilético, incluyendo al menos dos grandes grupos de aislamientos (I y II) que muestran evidencia de una larga historia de aislamiento reproductivo. Además establecen que el grupo II, por sus características genéticas, morfológicas y bioquímicas debía ser posiblemente reconocido como una nueva especie. El clado *A. flavus* “atípicos”, como se encuentra definido en este estudio, permite hipotetizar que podría tratarse de una nueva especie, y para fortalecerla taxonómicamente sería conveniente realizar un estudio incluyendo las cepas S aisladas en Australia, Estados Unidos y Benin.

Para *A. parvisclerotigenus* no fue posible arribar a una conclusión taxonómica en el estudio filogenético. Morfológicamente muy similar a *A. flavus* “atípicos” pero diferente en cuanto al perfil de producción de extrolitos, hace necesario un estudio de mayor número de aislamientos y con otros marcadores para establecer la relación entre estas dos especies.

Las especies productoras de aflatoxinas (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bomycis*, *A. pseudotamarii*, *A. caelatus* y los aislamientos denominados *A. parasiticus* II y *A. flavus* “atípicos”) quedaron esparcidas por todo el dendograma. Estos resultados sugieren que, en ausencia de recombinación sexual, y como la producción de toxinas es muy compleja y poco probable de ser independientemente adquirida, la habilidad de producir aflatoxinas fue perdida (o ganada) varias veces en la evolución (carácter convergente u homoplasias) (Tranh Dinh *et al.*, 1998; Varga *et al.*, 2003) Sin embargo Geiser *et al.* (1998) señalan que las especies toxigénicas tienen una historia de recombinación, pudiendo significar que el fenotipo toxigenico ha sido pasado

lateralmente entre aislamientos de diferentes *background* genético, por ejemplo por medio de heterocariosis.

*A. leporis* resultó ser basal a las otras especies de la sección de acuerdo a la secuenciación parcial de  $\beta$ -tubulina. Sin embargo se encontró muy relacionado a *A. flavus* en cuanto a las características morfológicas. Peterson (2000) y Rigó *et al.* (2002), basados en análisis filogenéticos observaron el mismo patrón de relación. Kozakiewicz (1989) sugirió que esta especie debería excluirse de la sección *Flavi* para pasar a formar parte de la sección *Wentii*, aunque Varga *et al.* (2003) la incluye nuevamente dentro de la sección *Flavi* pero formando un linaje muy separado del resto de los integrantes de la sección.

## 2. Consideraciones taxonómicas

Durante el desarrollo de este estudio se ha trabajado operacionalmente sobre la base del concepto morfológico de especie, describiendo las especies mediante caracteres diagnósticos (morfológicos, químicos, fisiológicos, secuenciación del gen de  $\beta$ -tubulina) que permitan diferenciarlos entre sí. En el marco teórico se siguió el concepto evolutivo de especies, donde se hipotetiza que estas diferencias pueden ser explicadas por ancestralidad común, y los conceptos de Harrington y Rizzo (1999) teniendo en cuenta la variación interespecífica.

Como consecuencia de este estudio proponemos dos especies nuevas para la sección *Flavi*, *A. minisclerotium* (*A. flavus* “atípicos”) y *A. arachidicola* (*A. parasiticus* II). A continuación se brinda la descripción de cada uno de ellas.

*Aspergillus minisclerotium* Pildain, Vaamonde, Frisvad & Samson sp. nov.

(Fig. 4.12)

Typus: (CBS 115635<sup>T</sup>, cultivo seco de M22N3 CBS115635 - cultivo liofilizado cultivado en agar Czapek, en oscuridad por 7 días) aislado de semilla de *Arachis hypogea*, Manfredi, provincia de Córdoba, Argentina.

Etimología: referido al tamaño de los esclerocios, característico de este nuevo taxón. La descripción de *A. minisclerotium* se basó en los aislamientos obtenidos en la Argentina (Vaamonde, *et al.*, 1995; Pildain, *et al.*, 2004; Pildain, *et al.*, 2005).

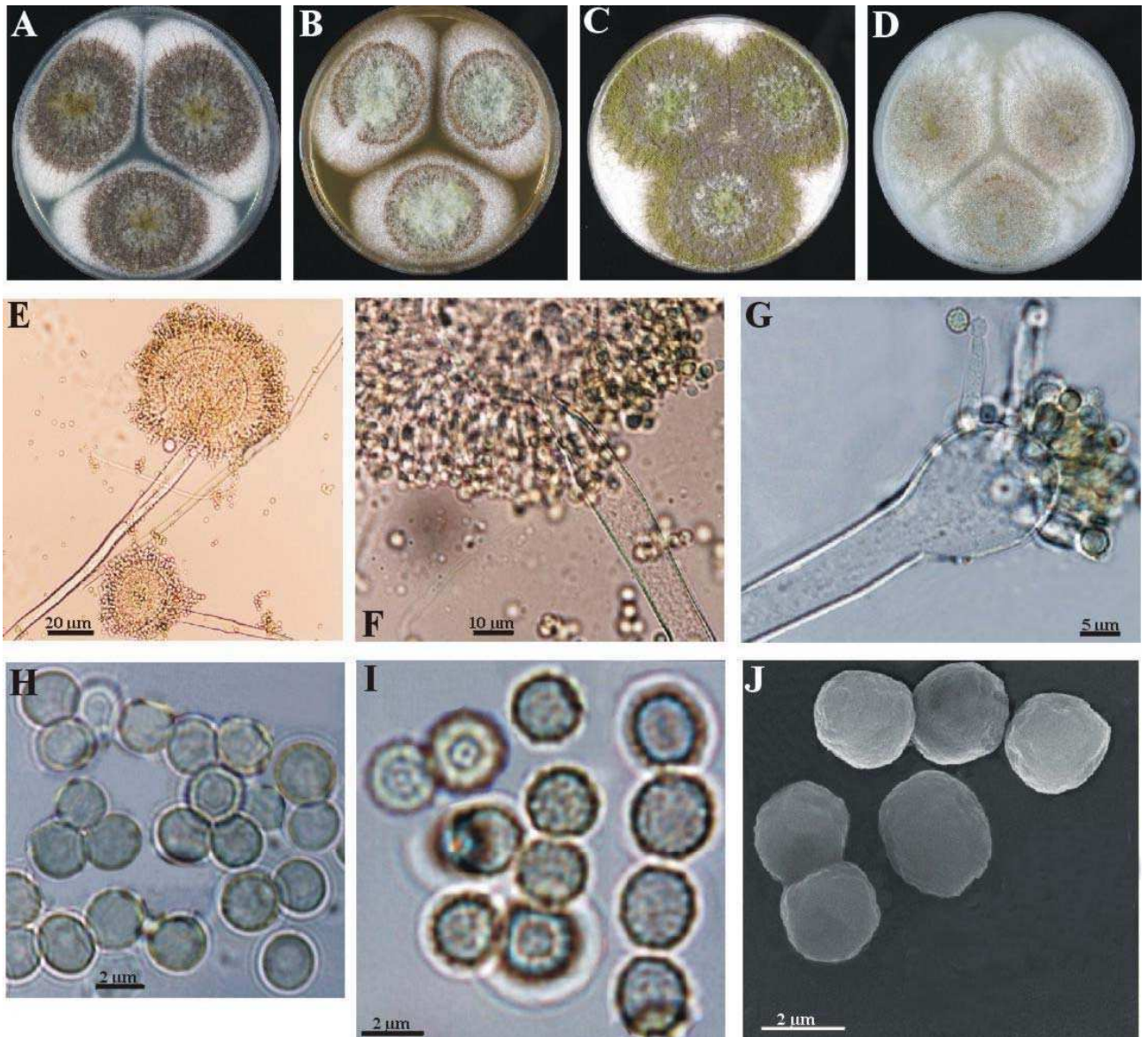
Colonias en YES, MEA, OA, CYA alcanzan un diámetro de 60-70mm luego de 7 días a 25°C, como también en CYA a 37°C (Fig. 4.12.A, B, C, D). Superficie de la colonia con micelio poco aéreo, en OA y MEA micelio flocoso, textura compacta. Micelio vegetativo blanco muy abundante, con escasas cabezuelas conidiales y densamente poblado de esclerocios negros. Estructuras conidiales verde luminosos-verde amarillento (29-E5, Kornerup y Wanscher, 1978) *en masse*; reverso de la colonia naranja amarillento a naranja castaño en YES, castaño amarillento a castaño luminoso en MEA y OA, castaño en CYA. No se observaron exudados. Acido aspergílico producido en AFPA. Diámetros de esclerocios entre 150 y 300µm (3 réplicas por aislamiento, 30 esclerocios por replica).

Cabezuelas conidiales normalmente biseriadas, consistiendo en metulas y fialides. Estípites de conidioforos largos en promedio 1200µm y máximo 2000µm, ancho en promedio 11.76µm y máximo 21µm, pared groseramente rugosa. Diámetro de la vesícula en promedio, 41.35µm globosa a subglobosa. Métulas cilíndricas 3.25-4.8µm x 11-14µm; fialides 3-5µm x 6-10µm (Fig. 4.12.E, F, G). Conidios elipsoidales o subglobosos (2.3)3-4.17(6) µm de diámetro, verde pálido, pared lisa a finamente rugosa (Fig. 4.12.H, I, J).

*A. minisclerotium* crece bien a 25, 37y 42°C.

Producción de extrolitos: ácido aspergílico, ácido kójico, ácido ciclopiazónico, aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub>, aflatoxina G<sub>2</sub>, paspalina-paspalinina, kotanina-like, aflavininas, aflatrem.

**Fig. 12. A, B, C, D)** Aspecto de la colonia de *A. minisclerotium* a los 7 días en CYA; MEA; YES; OA. **E, F, G)** Conidióforo, métulas y fialides; Ornamentación del estípite; Vesícula. **H, I)** Conidios a MO. **J)** Conidios a SEM.



*Aspergillus minisclerotium* y *A. flavus* se distinguen genéticamente con varias sustituciones de nucleótidos presentes en la comparación de sus secuencias de  $\beta$ -tubulina. Además, por patrones de producción de extrolitos diferentes, tamaño y ornamentación de los conidios y tamaño de los esclerocios, siendo esta característica la más consistente y reproducible para distinguir aislamientos de estas dos especies.

Con *A. parvisclerotigenus* (CBS121.62<sup>T</sup>) comparten las mismas características morfológicas pero el patrón de producción de extrolitos es diferente (*A. minisclerotium* produce aflavininas y aflatrem), al igual que la secuencia del gen  $\beta$ -tubulina. Podría tratarse de especies crípticas pero más estudios son necesarios ya que los dos aislamientos de *A. parvisclerotigenus* utilizados en la secuenciación no mostraron resultados a partir de los cuales se pueda llegar a una conclusión sobre esta especie.



*Aspergillus arachidicola* Pildain, Frisvad & Samson sp. nov.

(Fig. 4.13)

Typus: CBS 117610<sup>T</sup> (cultivo seco de M7H3 CBS117610 - cultivo liofilizado cultivado en agar Czapek, en oscuridad por 7 días) aislado de hoja de *Arachis glabrata*, provincia de Corrientes, Argentina.

Etimología: derivado del nombre del género del maní, *Arachis*, de donde se aislaron las cepas. La descripción de *A. arachidicola* se basó en los aislamientos obtenidos en la provincia de Corrientes, Argentina, a partir de hojas de *A. glabrata*.

Colonias en YES, MEA, OA y CYA alcanzan un diametro de 60-65mm en 7 días a 25°C y en CYA a 37°C. Superficie de la colonia aterciopelada, con abundantes cabezuelas conidiales en tonos oliváceos a castaños *en masse* (3-E8; 4-E7. Kornerup & Wanscher, 1978), manteniendo el mismo color a los 14 días. Reverso verde amarillento; no se observaron exudados. Esclerocios ausentes (Fig. 4.13.A, B, C, D). Cabezuelas conidiales uniseriadas o biseriadas, radiadas dividiéndose en columnas divergentes en a la madurez. Estipites incoloros, finamente rugosos, variables en largo mayormente (250) 400-600 (1000)µm; con un diametro inmediatamente debajo de la vesícula (6.5-) 9-10. Vesículas globosas a subglobosas (23-) 28-49 µm de diametro, fértiles sobre el 75% de su superficie; metulas 9.5-13.5 x 5-6.5µm; fialides 7-11 x 3-6.5µm (Fig. 4.13. E, F). Conidios globosos a subglobosos, equinulados, frecuentemente con tejido conectivo, verdosos (3.5-) 4.5-5 (-6.5) µm (Fig. 4.13.G, H).

*A. arachidicola* crece bien a 25, 37 y 42°C.

Producción de extrolitos: ácido kójico, , aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub>, aflatoxina G<sub>2</sub>, parasiticólido, crisogina.

Dentro de la sección *Flavi*, *A. arachidicola* se asemeja a *A. caelatus* en la morfología de la colonia. Sin embargo, los aislamientos de *A. arachidicola* producen conidios equinulados y *A. caelatus* presenta conidios con ornamentación tubercular y cuerpo

esporógeno (Horn, 1997). Los aislamientos de estos 2 grupos resultaron en ramas diferentes y con alto valor de soporte en el árbol de  $\beta$ -tubulina, y además presentan diferentes patrones de producción de extrolitos.

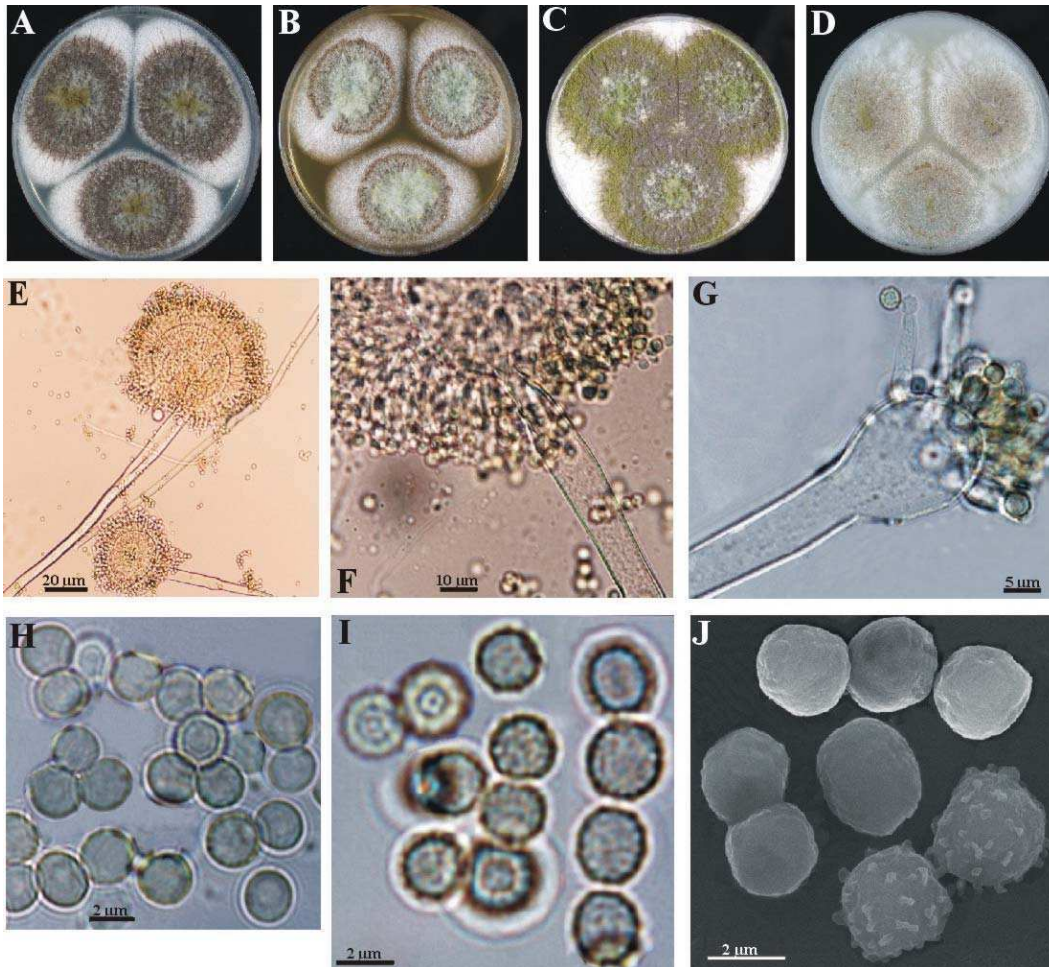
*A. parasiticus* es distinguible microscópicamente de *A. arachidicola* por el color verde oscuro de sus colonias (Raper & Fennell, 1965). La forma y ornamentación de los conidios de *A. arachidicola* se superponen con las de *A. parasiticus*. Ambas especies producen aflatoxinas B y G pero no CPA. La producción de crisogina y los resultados negativos en AFPA por parte de *A. arachidicola* son caracteres valiosos para distinguir estas dos especies.

*A. flavus* es muy diferente de *A. arachidicola* por sus características colonias verde amarillentas (Raper & Fennell, 1965). Ambas especies comparten los estípites con pared rugosa pero *A. flavus* generalmente tiene estípites más largos (mas de 1000 $\mu$ m), también presenta conidios menos equinulados. Además los aislamientos de *A. flavus* son capaces de producir aflatoxinas B, CPA y ácido aspergílico (Samson *et al.*, 2000), presentando por lo tanto un perfil de producción de extrolitos distinto al de *A. arachidicola*. Todas las diferencias morfológicas, producción de extrolitos y la secuenciación de  $\beta$ -tubulina sugieren diferencias remarcables entre estas dos especies.

Los conidios de *A. arachidicola* presentan una rugosidad intermedia entre los de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Este es un carácter que esta nueva especie comparte con las cepas "O" propuestas por Feibelman *et al.* (1998), con la diferencia de que estas cepas son muy cercanas a *A. nomius* y *A. arachidicola* esta relacionada con *A. parasiticus* (Feibelman *et al.*, 1998). *A. arachidicola* no produce esclerocios y las cepas O se definieron como productoras. Se deberían realizar mas estudios para establecer la correcta relación entre estos aislamientos.

La cepa *A. flavus var. flavus* CBS108.30 que fue identificada como tipo FP-1 por Kumeda *et al.* (2003) necesita ser incluida dentro de la especie *A. parasiticus* debido a su morfología, producción de extrolitos y la posición que adquirió en el árbol filogenético (Fig. 4.11). Nuestro objetivo al analizar CBS108.30 fue clarificar si *A. arachidicola* pertenecía al clado identificado como FP-1, intermedio entre *A. parasiticus* y *A. flavus*, (Kumeda *et al.*, 2003) Nuestros resultados mostraron que CBS108.30 pertenece a un clado diferente al de *A. arachidicola*.

**Fig. 4.13.** A, B, C, D) Aspecto de la colonia de *A. arachidicola* a los 7 días en CYA; MEA; YES; OA. E, F) Vesícula, métulas y fiálides. G) Conidios a MO. H) Conidios a SEM.



#### CONCLUSIONES PARCIALES

- El estudio de la sección *Flavi* requiere de la utilización de diferentes disciplinas debido a la superposición de caracteres entre los miembros de este grupo.
- La quimiotaxonomía aparece como una herramienta de mucha utilidad para resolver problemas taxonómicos dentro de la sección.
- La habilidad de producir aflatoxinas fue perdida (o ganada) varias veces en la evolución de los integrantes de la sección *Flavi*.

Recomendaciones taxonómicas:

Se definen 2 nuevas especies para la sección *Flavi*, *A. arachidicola* y *A. minisclerotium*, a partir de aislamientos procedentes de hojas de maní de especies autóctonas de la Argentina.

*A. tamaritii* y *A. flavufurcatus* deben ser consideradas como una sola especie, *A. tamaritii*.

*A. oryzae*, *A. subolivaceus* y *A. thomi* son variantes morfológicas de la especie *A. flavus*.

*A. zhaoqingensis* debe incluirse dentro de la especie *A. nomius*.

*A. sojae*, *A. toxicarius*, *A. terricola* var. *americanus* son variantes morfológicas de la especie *A. parasiticus*.



- *A. flavus* y *A. parasiticus* son las especies dominantes de la sección *Flavi* en maní cultivado y nativo de la Argentina, y se encuentran ampliamente distribuidos en las zonas maniseras. *A. flavus* es mas frecuente en maní cultivado, tanto en semillas como en hojas, contrariamente a la hipótesis establecida en trabajos anteriores.
- Se reafirma la hipótesis de que la contaminación por *A. flavus* observada en maní durante el almacenamiento proviene de la pre-cosecha
- La incidencia de las especies de la sección *Flavi*, y en particular de *A. flavus*, se encuentra asociada a factores microclimáticos practicas agro culturales y cultivares propios de cada una de las zonas agroecológicas analizadas.
- *flavus* típicos, productores de esclerocios tipo L y con quimiotipo I son los mas frecuentemente aislados a partir de maní en la Argentina.
- Las cepas tipo S de la Argentina presentan un patrón de producción de aflatoxinas característico, solo asociado a estos aislamientos productores de esclerocios pequeños. Su incidencia estaría relacionada con climas secos y temperatura elevada.
- La producción de esclerocios y aflatoxinas están correlacionadas positivamente. La capacidad de producir esclerocios y aflatoxinas se encuentra determinada por factores bióticos y abióticos, que dependen del sistema bajo estudio. Estos factores parecen ser la luz, temperatura y sustrato.
- Ratificamos que, debido a la importantísima frecuencia de productores de CPA, se justifica el estudio de la ocurrencia natural de este metabolito.
- Los VCGs son un marcador multilocular efectivo siendo particularmente útil para caracterizar estructura genética de poblaciones de *A. flavus* en la Argentina. Se fortalece la hipótesis de estrecha correlación entre los VCGs identificados, la producción de alfatoxinas y de CPA, asi como con la producción de esclerocios.

- La variabilidad genética de las poblaciones de *A. flavus* son particulares para cada región analizada, dependiendo de características como temperatura media, latitud, altura, tipo e historia del suelo, secuencia de cultivos, niveles de insectos, frecuencia de precipitaciones y practicas culturales.
- Las cepas típicas y atípicas de *A. flavus* tienen una estructura poblacional propia, no hay VCGs establecido hasta el momento que incluya ambos tipos de cepas.
- Del estudio filogenético se ratifica la hipótesis de que la habilidad de producir aflatoxinas fue perdida (o ganada) varias veces en la evolución de los integrantes de la sección *Flavi*.
- Las cepas atípicas de *A. flavus*, productoras de ambos tipos de aflatoxinas y esclerocios pequeños, deben considerarse como una nueva especie. Se denominó a la misma como *A. minisclerotium*.
- En base a consideraciones morfológicas, producción de extrolitos y análisis moleculares se recomiendan modificaciones taxonómicas para la sección *Flavi*. Se establecen 2 especies nuevas para la sección *Flavi* y se aconseja sinonimizar *A. flavufurcatus* con *A. tamarii*; *A. oryzae*, *A. subolivaceus* y *A. thomi* con *A. flavus*; *A. sojiae*, *A. toxicarius*, *A. terricola* var. *americanus* con *A. parasiticus*.





- Abarca ML. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S79-S84.
- Abarca ML, Accensi F, Bragulat M, Cabañes F. 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *J. Food Protection.* 64: 903-906.
- Adams J, Hansche PE. 1974. Population studies in microorganisms I. Evolution of diploidy in *Sacharomyces cerevisiae*. *Genetics* 76: 327-338.
- Adams TH, Wieser JK, Yu J. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 35-64.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1992. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega, Barcelona, España, 1146p.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. 868p.
- Anagnostakis SL, Kranz J. 1987. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology* 77: 751-754.
- Atkins PW. 1978. *Physical Chemistry*. Oxford University Press., U.K, 586p.
- Barros G, Torres A, Palacio G, Chulze S. 2003. *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at plating and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *J. Sci. Food Agr.* 83, 1303-1307.
- Barros G, Torres A, Chulze S. 2005. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *J. Sci. Food Agr.* 85: 2349-2353.
- Barry D, Widstrom NW, Darrah LL, McMillan WW, Riley TJ, Scott GE, Lillehoj EB. 1992. Maize ear damage by insects in relation to genotype and aflatoxin contamination in preharvest maize grain. *J. Econ. Entomol.* 85: 2492-2495.
- Bayman P, Cotty PJ. 1991a. Improve media for selecting nitrate-nonutilizing mutants in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 83: 311-316.
- Bayman P, Cotty PJ. 1991b. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canad. J. Bot.* 69: 1707-1711.
- Bayman P, Cotty PJ. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus* : association with aflatoxin production and morphology. *Canad. J. Bot.* 71: 23-31.
- Beadle GW, Coonradt VL. 1944. Heterokaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* 29: 291-308.

- Bennet JW, Horowitz PC, Lee LS. 1979. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia* 71: 415-422.
- Bigelow DM, Orum TV, Cotty PJ, Nelson MR. 2000. Monitoring *Aspergillus flavus* AF36 and S strain incidence in the desert Southwest. 2000 APS Pacific division meeting abstracts (joint with Canadian Phytopathological Society), Victoria, BC, Canada.
- Bilgrami KS, Sinha SP, Jeswal P. 1998. Loss of toxigenicity of *Aspergillus flavus* strains during subculturing – a genetic interpretation. *Curr Sci* 57: 551-552.
- Blaney B., Kelly MA, Tyler AL., Connole MD. 1989. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by Queensland isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Aust. J. Agric. Res.* 40: 395-400.
- Blankenship PD, Cole RJ, Sanders TH, Hill RA. 1984. Effect of geocarposphere temperature on preharvest colonization of drought-stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. *Mycopathologia* 85: 69-74.
- Bock CH, Cotty PJ. 1999. Wheat seed colonized with atoxigenic *Aspergillus flavus*. Characterization and production of a biopesticide for aflatoxin control. *Biocontrol Sci. Technol.* 9: 529-543.
- Bode HB, Bethe B, Hofs R, Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore Nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3: 619–627.
- Bosland PW, Williams PH. 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographical origin. *Canad. J. Bot.* 65: 2067-2073.
- Boyd ML, Cotty PJ. 2001. *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of Leguminous trees of the Sonoran desert in Arizona. *Phytopathology* 91: 913-919.
- Bradburn N, Coker RD, Blunden G. 1994. The aetiology of turkey “X” disease. *Phytochemistry* 35: 817.
- Bragachini MA. 1994. Maní : implantación, cuidados culturales, cosecha, secado y almacenaje. Manfredi : INTA-EEA Manfredi, 152p.
- Brooker NL, Leslie JF, Dickman MB. 1991. Nitrate nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81: 672-677.

- Brown RL, Cotty P.J, Cleveland TE. 1991. Reduction in aflatoxin content maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. J. Food Prot. 54: 623-626.
- Brown RL, Bhatnagar D, Cleveland TE, Cary JW. 1998. Recent advances in preventing mycotoxin contamination. En Mycotoxins in agriculture and food safety, ed. by Sinha KK y Bhatbagar D, Marcel Dekker, NY, pp 351-379.
- Bu'Lock J.D. 1965. The Biosynthesis of Natural products. McGraw-Hill, NY, 535p.
- Büchi G, Rae ID. 1969. The structure and chemistry of aflatoxins. En Aflatoxins. Goldblatt, L.A. (ed) Academic Press, New York, USA. pp. 55-75.
- Bunting AH., Gibbons RW, Wynne JC. 1985. Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). En Grain Legume Crops. Summerfield, R.J., & Roberts, E.H. (eds.) Collins. London, England. pp. 747-800.
- Byrd AD, Schardl CL, Bowdish TI, Johnston J. 1995. Mutualistic transfer of *Epichloë spermatia* by *Phorbia* flies. Mycologia 87: 182-189.
- Calvo AM, Hinze LL, Gardner HW, Keller NP. 1999. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. Appl. Environ. Microbiol 65: 3668-3673.
- Calvo A, Gardner HW, Keller NP. 2001. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. J Biol Chem 276:25766-25774.
- Calvo AM, Bok J, Brooks W, Keller NP. 2004. *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4733-4739.
- Cardwell KF, Cotty PJ. 2002. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Bénin, West Africa. Plant Dis. 86: 434-439.
- Causin RG. Figimelica L, Montecchio, Mutto Accordi S. 1995. Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among Italian isolates of *Cryphonectria parasitica*. Eur. J. Forest Pathol. 25: 232-239.
- Chang PK, Bennet JW, Cotty PJ. 2001. Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia 153: 41-48.
- Chang PK, Wilson RA, Keller NP, Cleveland TE. 2004. Deletion of the  $\Delta 12$ -oleic acid desaturase gene of a nonaflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* field isolate affects conidiation and sclerotial development. J. Appl. Microbiol. 97: 1178-1184.
- Chet I, Henis Y. 1975. Sclerotial morphogenesis in Fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 13: 168-211.

- Cleveland TE, Dowd PF., Desjardins A, Bhatnagar D, Cotty PJ. 2003. Unites States Department of Agriculture – Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Manag. Sci.* 59: 629-642.
- Cole RJ, Cox RH. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, New York, USA, 937p.
- Cole RJ. 1986. Etiology of Turkey "X" Disease in retrospect: A case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotox. Res.* 2: 3-7.
- Correll JC, Puhalla JE, Schneider RW. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. *Phytopathology* 76:396-400.
- Correll JC, Klittich JR, Leslie JF. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- Correll JC. 1991. The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 1061-1064.
- Cotty PJ. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808-814.
- Cotty PJ, Cleveland TE, Brown RL, Mellon JE. 1990. Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3885-3887.
- Cotty P.J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84: 1270-1277.
- Cotty P.J., Bayman P., Engel D.S., Elias K.S. 1994. Agriculture aflatoxins and *Aspergillus*. En *The Genus Aspergillus from taxonomy and genetics to industrial application*. Powell, K.A., Renwick, A., & Pederby, J.F. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp: 1-27.
- Cotty PJ. 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycol. Res.* 101: 69-704.
- Cotty PJ, Cardwell KF. 1999. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2264-2266.

- Cove DJ. 1976a. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36:191–203.
- Cove DJ. 1976b. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. Studies of mutants altered in nitrate assimilation. *Mol. Gen. Genet.* 23 :147–159.
- Cove DJ. 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev. Camb. Philos Soc.* 54: 291–327.
- Croft JH, Jinks JL. 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.
- Crow JF, Kimura M. 1965. Evolution in sexual and asexual populations. *American Naturalist* 94: 439-450.
- Cullen JM, Wilson ME, Hagler WM, Ort JF, Colen RJ. 1988. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *Am. J. Vet. Res.* 49: 728-731.
- De Fina AL. 1992. Aptitud agroclimática de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. 427p.
- Demain AL, Fang A. 2000. The natural function of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69: 1-39.
- Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS, Klich MA. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 249-270.
- Dorner JW, Cole RJ, Lomax LG, Gosser HS, Diener UL. 1983. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 698-703.
- Dorner JW, Cole RJ, Blankenship PD. 1992. Use of a biocompetitive agent to control preharvest aflatoxin in drought stressed peanuts. *J. Food. Prot.* 55: 888-892.
- Dorner JW, Cole RJ, Wicklow DT. 1999. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. *J. Food Prot.* 62: 650-656.
- Dowd PF. 1998. Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. En *Mycotoxins in agriculture and food safety*, ed. by Sinha KK y Bhatbagar d., Marcel Dekker, NY, pp 351-379.
- Doyle JJ, Davis JJ. 1998. Homology in molecular phylogenetics: a parsimony perspective. En DE Soltis, PS Soltis & JJ Doyle eds. *Molecular systematics on Plants II: DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers, pp 101-131.

- Drummond J, Pinnock DE. 1990. Aflatoxin production by entomopathogenic isolates of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. J. Invertebr. Pathol. 55: 332-336.
- Egel DS, Cotty PJ, Elias KS. 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *Flavi* that vary in aflatoxin production. Phytopathology 84: 906-912.
- Ehrlich K., Montalbano BG, Cotty PJ. 2003. Sequence comparison of *aflR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. Fungal Genet. Biol. 38: 63-74.
- Ehrlich KC, Yu J, Cotty PJ. 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. J. Appl. Microbiol. 99: 518-527.
- Farris J. 1989. The retention index and rescaled consistency index. Cladistics 5:417-419.
- Feibelman TP, Cotty PJ, Doster MA, Michailides TJ. 1998. A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. Mycologia 90: 618-623.
- Felsenstein J. 1985a. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Fernandez Pinto V, Patriarca A, Locani O, Vaamonde G. 2001. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. Food add. Contam. 18: 1017-1020.
- Filtenborg O, Frisvad JC. 1980. A simple screening method for toxigenic molds in pure cultures. Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie 13, 128-130.
- Filtenborg O, Frisvad JC, Svendsen JA. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Appl. Environ. Microbiol. 45, 581-585.
- Fincham JRS, Day PR. 1963. Fungal Genetics Botany Monographs. W. O. James (Ed.). Vol.4, Davis, Philadelphia., 326p.
- Freitas F., Freitas JZF. 2003. Relatos sobre mudanças alimentar-cultural em comunidades do Parque Indígena do Xingu. Série Documentos da Embrapa, Brasília - DF.
- Frisvad JC, Thrane U. 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). J. Chromatog. A 404: 195-214.

- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. 2005. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycol.* 49: 201-243.
- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 442-453.
- Gams W, Christensen M, Onions AHS, Pitt JI, Samson RA. 1985. Intrageneric taxa of *Aspergillus*. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp: 55-64.
- Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 388-393.
- Geiser DM, Dorner JW, Horn BW, Taylor JW. 2001. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 31: 1-11.
- Gilbert J. 1991. Regulatory aspects of mycotoxins in the European Community and USA. En *Fungi and mycotoxins in stored products: proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand 23-26 April, 1991*. Champ, B.R., Highley, E. Hocking, A.D., & Pitt, J.I. (eds.). ACIAR Proceedings N° 36. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. pp: 194-197.
- Glass NL, Kuldau GA. 1992. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 201-224.
- Glass NL, Donaldson GC. 1995. Development of Primer Sets Designed for use with the PCR to amplify conserved genes from Filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4): 1323-1330.
- Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. 2000. The genetics of hiphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* 34: 165-186.
- Glass NL, Kaneko I. 2003. Fatal Attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 2: 1-8.
- Goloboff PA. 1998. *Principios básicos de la cladística*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, 81p.

- Gordon TR, Okamoto D. 1991. Vegetative compatibility of groupings in a local population of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* 69:168–172.
- Gregory WC, Krapovickas A, Gregory MP. 1980. Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: R.J. Summerfield and A.H. Bunting, eds *Advances in legume science*. Royal Botanic Gardens, Kew, England, U.K, pp. 469-481.
- Harrington TC, Rizzo DM. 1999. Defining species in the fungi. In *Structure and dynamics of fungal populations*. JJ Worrall ed. Kluwer academic, Dordrecht., pp 43-70.
- Hesseltine CW, Shotwell OL, Smith M, Ellis JJ, Vandegrift E, Shannon G. 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. In *Proceedings of the first U.S.-Japan Conference on toxic micro-organisms; mycotoxins and botulism*, Honolulu, Hawaii, October 7-8, 1968. (M. Herzberg, ed). pp. 201-211. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C. USA.
- Hiemstra JA, Rataj-Guranowska M. 2003. Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from the Netherlands as compared to VCG diversity in Europe and in the USA. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 827-839.
- Hill RA, Blankenship PD, Cole RJ, Sanders TH. 1983. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 628-633.
- Hill RA, Wilson DM, McMillian WW, Widstrom NW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD. 1985. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In: Lacey J, ed. *Trichothecenes and other Mycotoxins*. Chichester, UK: J. Wiley and S.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42: 182-192.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. 1996. *Molecular systematics*. Sinauer, Sunderland eds. 655pp.
- Hocart MJ, Lucas JA, Peberdy JF. 1993. Characterization of the parasexual cycle in the eyespot fungus *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycol. Res.* 97: 967-976.
- Hocking AD. 1997. Toxigenic *Aspergillus* species. In *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (eds.) ASM Press, Washington D.C., USA. pp: 393-405.
- Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990. *Index herbariorum*. Part I: The herbaria of the world. 8th edition. New York Botanical Garden., 693p.



- Horn BW, Dorner JW, Greene RL, Blankenship PD, Cole RJ. 1994. Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathologia* 125: 179-191.
- Horn BW, Dorner JW. 1995. Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2472-2475.
- Horn BW, Greene RL. 1995. Vegetative compatibility within populations of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii* from a peanut field. *Mycologia* 87: 324-332.
- Horn BW, Greene RL, Sovalev VS, Dorner JW, Powell JH. 1996. association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*. *Mycologia.* 88: 574-587
- Horn BW. 1997. *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. *Mycotaxon* 61: 185-191.
- Horn BW, Dorner J.W. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1444-1449.
- Horn BW, Greene RB, Sorensen PD, Blankenship PD, Dorner JW. 2000. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in peanut fields following application to soil. *Mycopathologia* 151: 81-92.
- Horn BW. 2005. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia* 97: 202-217.
- Hua SST, Baker JL, Flores-Espirity M. 1999. Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* mutant of Dorner J.W., Cole R.J.,. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2738-2740.
- ICMSF. 1996. *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens.* Blackie Academic & Professional, London, UK. pp. 347-381.
- INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina). [www.indec.gov.ar](http://www.indec.gov.ar).
- Irwin DM, Wilson AC. 1991. Limitations of molecular methods for establishing the phylogeny of mammals, with special reference to the position of elephants. En *American Museum of Natural History Symposium on Mammalian Phylogeny*, Szalay FS, Novacek MJ & McKenna MC eds. New York: Springer Verlag., 485p

- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycol. Res. 105: 233-239.
- Jacobsen DJ, Gordon TR. 1990. Further investigations of vegetative compatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Can. J. Bot. 68: 1245-1248.
- Jones RH, Duncan HE, Payne GA, Leonard JL. 1980. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk-inoculated corn. Plant Dis. 64: 859-863.
- Jones RK, Duncan HE. 1981. Effect of nitrogen fertilizer, planting date, and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. Plant Dis. 65: 741-744.
- Kafer E. 1961. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics 46: 1581-1609.
- Katan T, Katan J. 1988. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and rhizosphere of cotton plants. Phytopathology 78: 852-855.
- Katan T, Hadar, Katan J. 1989. Vegetative compatibility of *F. oxysporum* f sp. *dianthi* from carnation in Israel. Pl. Pathol. 38: 376-381.
- Katan T, Berliner R, Katan J. 1994. Vegetative compatibility in populations of *Fusarium oxysporum* from wild carnation. Mycol. Res. 98: 1415-1418.
- Kazumoto I, Maruyama J, Juvvadi PR, Nakajima H, Kitamoto K. 2005. Visualizing nuclear migration during conidiophore development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus oryzae*: multinucleation of conidia occurs through direct migration of plural nuclei from phialides and confers greater viability and early germination in *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 747-754.
- Khon LM. 2005. Mechanisms of Fungal speciation. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 279-308.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JC. Dictionary of the Fungi 9th edition. CABI publishing, Wallingford UK, 678p.
- Klich MA, Thomas SH, Mellon JE. 1984. Field studies on the mode of entry of *Aspergillus flavus* into cotton seeds. Mycologia 76: 665-669.
- Klich MA, Lee LS, Huizar HE. 1986. The occurrence of *Aspergillus flavus* in vegetative tissue of cotton plants and its relation to seed infection. Mycopathologia. 95: 171-4.

- Klich MA, Pitt JI. 1988a. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia, 103p.
- Klich MA, Pitt J I. 1988b. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Trans. Br. Mycol. Soc. 91: 99-108.
- Klich MA, Cleveland TE. 2000. *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of mycotoxin biosynthesis. En Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.) Hardwood Academic Publishers, Australia. pp: 425-434.
- Klittich CJ, Leslie JF. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Giberella fujikuroi*). Genetics 118: 417-423.
- Kluge AG, Farris JS. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Zool. 18:1-32.
- Koenig RL, Ploetz RC, Kistler HC. 1997. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small Number of divergent and globally distributed clonal lineages. Phytopathology 87: 915-923.
- Kokalis-Burelle N, Porter DM, Rodríguez-Kábana R, Smith DH, Subrahmanyam P. Eds. 1997. Compendium of peanut diseases. 2<sup>nd</sup> ed. St. Paul, Minnesota: APS Press 94p.
- Kornerup A, Wanscher J H. 1978. Methuen handbook of color. 3rd ed. London, United Kingdom: Methuen, 252p.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers 161, 188 pp.
- Krapovickas A, Gregory WC. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia 1-4:1-186.
- Kumeda Y, Asao T, Takahashi H, Ichinoe M. 2003. High prevalence of B abd G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field in Japan: heteroduplex panel análisis identifies a new genotype within *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 229-23.
- Kurtzman CP, Smiley MJ, Robnett CJ, Wicklow DT. 1986. DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. Mycologia 78: 955-959.

- Kurtzman CP, Horn BW, Hesselstine CW. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Ant. van Leeuwenhoek* 53: 147-158.
- LaMondia JA, Elmer WH. 1989. Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus tissues. *Can. J. Bot.* 67:2420-2424.
- Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN. (1990) Vegetative compatibility within *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* and its relationship to virulence, aggressiveness and race. *Can. J. Microbiol.* 36: 352-358.
- Leger St. RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B. 2000. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 320-324.
- Leslie JF. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.
- Leslie JF. 1996. Fungal vegetative compatibility – Promises and prospects. *Phytoparasitica* 24: 1-6.
- Lhoas P. 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genet. Res.* 10: 45-61.
- Long K, Ghazali HM, Ariff A, Man YC, Bucke C. 1998. Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link. *Biotechnol Lett* 20: 369-372.
- Mayr E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Naturalist* 74: 249-278.
- McAlpin CE, Manarelli B. 1995. Construction and characterization of a DNA probe for distinguishing strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1068-1072.
- McAlpin CE, Horn BW, Wicklow DT. 2005. DNA fingerprinting analysis of vegetative compatibility groups in *Aspergillus caelatus*. *Mycologia* 97: 70-76.
- Nesci A, Etcheverry M. 2002. *Aspergillus* section Flavi populations from field maize in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 434-438.
- Nielsen KF, Smedsgaard J . 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *J. Chromatog. A* 1002: 111–136.
- Nikkuni S, Nakajima H, Hoshina S, Ohno M, Suzuki C, Kashiwagi Y, Mori K. 1998. Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based

- on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 225-230.
- Nixon KC, Carpenter JM. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- Novas MV, Cabral D. 2002. Association of Mycotoxin and Sclerotia Production with Compatibility Groups in *Aspergillus flavus* from Peanut in Argentina. *Plant Dis.* 86: 215-219.
- Nuehring LP, Rowland GN, Harrison LR, Cole RJ, Corner JW. 1985. Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1670-1676.
- Olanya OM, Hoyos GM, Tiffany LH, McGee DC. 1997. Waste corn as a point source of inoculum for *Aspergillus flavus* in the corn agroecosystem. *Plant Dis.* 81: 576-581.
- Olinuck JA. 2004. Informe agrometeorológico de la localidad de Cerro Azul – Año 2003. INTA – Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. 24p.
- Orr HA, Otto SP. 1994. Does diploidy increase the rate of adaptation. *Genetics* 136: 1475-1480.
- Orum TV, Bigelow DM, Nelson MR, Howell DR, Cotty PJ. 1997. Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona, soils. *Plant Dis.* 81: 911-916.
- Orum TV, Bigelow DM, Cotty PJ, Nelson MR. 1999. Using predictions based on geostatistics to monitor trends in *Aspergillus flavus* strain composition. *Phytopathology* 89: 761-769.
- Page RD, Holmes EC. 1998. Molecular evolution. A phylogenetic approach. Blackwell Science, Oxford, 346p.
- Papa KE. 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 65: 1201-1205.
- Papa KE. 1986. Heterokarion incompatibility in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 78: 98-101.
- Paquin C, Adams J. 1983. Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. *Nature* 302: 495-300.
- Parodi, L. 1972. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. 2° vol. Ed. ACME SACI. Bs. As. 140p.
- Pedelini R, Casini C. 1998. Manual del Maní 3ra. Ed. EEA Manfredi INTA. 79p.
- Perrot V, Richerd S, Valero M. 1991. Transition from haploidy to diploidy. *Nature* 351: 315-316.

- Peterson S.W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based upon rDNA sequence analysis. In integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, ed. by Samson R.A. and Pitt J.I., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 323-355.
- Peterson SW, Ito Y, Horn BW, Goto T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- Pier AC. 1991. The influence of mycotoxins on the immune system. En *Mycotoxins and animal foos*. Smith, J.E. & Henderson, R.S. (eds.) CRC Press, Boca Raton, USA. pp: 489-497.
- Pildain MB, Vaamonde G, Cabral D. 2004. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and seclerotia production. *Int. J. Food Microbiol.*, 93: 31-40.
- Pildain MB, Cabral D, Vaamonde G. 2005. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado procedente de diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxicogénica. *RIA*, 34: 3-19.
- Pitt JI, Glenn DR, Hocking AD. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 109-114.
- Pitt JI, Hocking AD. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press. Sydney, Australia, 413p.
- Pitt JI. 1993. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Prot.* 56: 265-269.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Edn 2. Blackie Academic and Professional, London, UK. 510p.
- Pontecorvo G. 1956. The parasexual sycle in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 10: 393-400.
- Puhalla JE, Mayfield JE. 1974. The mechanism of heterokariotic growth in *Verticillium dahliae*. *Genetics* 76: 411-422.
- Puhalla JE. 1985. Classification of strains of *Fusarium* on the basis of vegetative compatibility. *Canad. J. Bot.* 63: 179-183.
- Purchase IFH. 1971. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18: 114-123.

- Rao BL, Husain A. 1985. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing "kodoa poisoning" in men and its production by associated fungi. *Mycopathologia*. 89: 177-180.
- Raper KB, Fennell DI. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA. 686p.
- Resnik SL, González L, Pacin AM, Viora M, Caballero GM, Gros EG. 1996. Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotox. Res.* 12: 61-66.
- Rigó K, Varga J, Tóth B, Téren J, Mesterházy A, Kozakiewicz Z. 2002. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48: 9-16.
- Romero A. 1994 (Tesis de Doctorado). Estudio florístico y ecológico de micromicetes xilófilos sobre tocones de *Eucalyptus viminalis* en el NE de la pcia. De Buenos Aires. FCEyN, UBA.
- SAGPYA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos). Ministerio de Economía y Producción (MECON). [www.sagpya.gov.ar](http://www.sagpya.gov.ar)
- Saito M, Tsuruta O, Siriacha P, Kawasugi S, Manabe M, Buangsuwon D. 1986. Distribution and aflatoxin production of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 24: 41-46.
- Saito M, Tsuruta O. 1993. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 37:31-36.
- Samson RA. 1979. A compilation of the Aspergilli described since 1965. *Studies in Mycol.* CBS Publishers, Baarn, The Netherlands. 18: 1-38.
- Samson RA, Gams W. 1985. Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Samson RA & Pitt JI. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp:31-54.
- Samson RA, Pitt JI. 1985. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, New York, USA, 483p.
- Samson RA, Pitt JI. 1990. *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Plenum Press, New York, USA, 478p.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. 2000. *Introduction to food- and airborne fungi*. 6th Edition, CBS-Utrecht, The Netherlands, 389p.

- Samson RA, Frisvad JC. 2005. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycol.* 49. 250p.
- Saupe SJ, Glass NL. 1997. Allelic specificity at the het-c heteokarion incompatibility locus of *Neurospora crassa* is determined by a highly variable domain. *Genetics* 146: 1299-1309
- Schoustra SE. 2004. Reducing fitness costs associated with antibiotic resistance – Experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Thesis Wageningen University, ISBN 90-8504-106-6.
- Scott PM. 1992. Methods for the detection and determination of nitrogen-containing mycotoxins. *Appl. Biochem. Microbiol.* 28: 617-625.
- Servicio Meteorológico Nacional. [www.meteofa.mil.ar](http://www.meteofa.mil.ar).
- Sétamou M, Cardwell KF, Schulthess F, Hell K. 1997. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of preharvest maize in Bénin. *Plant Dis.* 1: 1323-1327.
- Sharma RP, Salunkhe DK. 1991. Introduction to Mycotoxins. *In* Mycotoxins and Phytoalexins ed. R.P. Sharma y D.K. Salunkhe Telford Press and CRC Press, Florida, pp: 3-33.
- Shotwell, OL, Hesseline CW, Stubblefield RD, Sorenson WG. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428.
- Simpson CE, Starr JL. 2001. Registration of ‘COAN’ Peanut. *Crop Sci.* 41:918.
- Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mathur SB. 1991. An illustrated Manual on Identification of Some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their Mycotoxins. Danish Government of See Pathology for Developing Countries, Hellerup, Denmark, 232p.
- Smedsgaard J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *J. of Chromatog. A* 760: 264–270.
- Smith AF. 2002. Peanuts: The illustrious history of the goober pea. University of Illinois Press. Chicago, USA. 272p.
- Smith D, Onions AHS. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. IMI, Technical handbooks 2<sup>nd</sup>. Ed. Eham CAB International, 122p.
- Smith JE, Moss MO. 1985. Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance. John Wiley & Sons. Great Britain. 148p.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. Biometry, 2 edn. W. H. Freeman and Co. San Francisco, 859 p.



- Stoloff L. 1977. "Aflatoxins-An Overview" in *Mycotoxins in Human and Animal Health*, J.V.Rodricks, C.W.Hesseltine, and M.A.Mehlman (Eds.), Pathotox Publishers, Inc, Park Forest South,IL, pp.7-28.
- Swofford DL. 1993. PAUP, Phylogenetics Analysis using parsimony, version 3.1. Program and documentation. Laboratory of Molecular Systematics, Smithsonian Institution, Washington.
- Swofford DL. 2000. PAUP\* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC. 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 197-246.
- Trail F, Mahanti N, Linz J. 1995a. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology* 141: 755-765.
- Tran Dinh N, Kumar S, Pitt JI, Carter DA. 1998. Analysis of the molecular and evolutionary basis of toxigenicity in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In integration of molecular and morphological approaches to *Aspergillus* and *Penicillium* taxonomy. Ed. by Samson RA. and Pitt JI, Blackie Academic Profesional Press, London, pp. 323-355.
- Tran-Dinh N, Pitt JI, Carter DA. 1999. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycol. Res.* 103: 1485-1490.
- Upshall A. 1981. Parasexual processes in fungi. En Gull K, Oliver SG, eds. *The fungal nucleus*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 191-214.
- Vaamonde G, Varvsavsky E. 1979. Producción de aflatoxinas sobre diferentes variedades de maní. *Anales de la Asociación. Química Argentina* 67: 139-152.
- Vaamonde G, Degrossi C, Comerio R, Fernandez Pinto V. 1995. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 30: 191-198.
- Vaamonde G, Patriarca A, Fernández Pinto V, Comerio R, Degrossi C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 79-84.
- Vaillancuort LJ, Hanau RM. 1994. Nitrate-nonutilizing mutants used to study heterokariosis and vegetative compatibility in *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*). *Exp..Mycol.* 18: 311-319.

- Van Egmond HP. 1991. Regulatory aspects of mycotoxin in Asia and Africa. En Fungi and mycotoxins in stored products: proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand 23-26 April, 1991. Champ, B.R., Highley, E. Hocking, A.D., & Pitt, J.I. (eds.). ACIAR Proceedings N° 36. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. pp: 198-204.
- van Rensburg SJ. 1977. Role of epidemiology in the elucidation of mycotoxin health risks. En Mycotoxins in human and animal health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. & Mehlman, M.A. (eds.) Pathatox Publishers, Park Forest South, Illinois, USA. pp: 699-711.
- Varga J, Rigó K, Tóth B, Téren J, Kozakiewicz Z. 2003. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. Food Technol. Biotechnol. 41: 29-36.
- Wainwright M. 1992. Introducción a la Biotecnología de Hongos. Acribia, 228p.
- Weiss EA. 2000. Oilseed Crops. Edn 2. Blackwell Science. London, England. 364p.
- Wells TR, Kreutzer WA. 1972. Aerial invasion of peanut flower tissue by *Aspergillus flavus* under gnotobiotic conditions. Phytopathology 62: 797-(Abstr.).
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MS, & Gelfand DH (eds.): PCR protocols: a guide to methods and applications, pp 615-322.
- Wicklow DT. 1983. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn, eds. U.L. Diener, R.L. Asquith and J.W. Dickens. Auburn, Alabama: Alabama Agricultural Experiment station, pp. 6-12.
- Wicklow DT, Shotwell OL. 1983. Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Can. J. Microbiol. 29: 1-5.
- Wicklow DT, Wilson DM. 1986. Germination of *Aspergillus flavus* sclerotia in a Georgia maize field. Trans. Br. Mycol. Soc. 87: 651-653.
- Wilkinson HH, Ramaswamy A, Sim SC, Keller NP. 2004. Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. Mycologia 96: 1190-1198.
- Williams MJ, Chambliss CG.. 1999. Rhizoma perennial peanut.. In C.G. Chambliss (ed.) Florida forage handbook. Rep. SP253. Univ. of Florida Coop. Ext. Ser., Gainesville, FL. pp. 49-52.

- Xu H, Annis S, Linz J, Trail F. 2000. Infection and colonization of peanut pods by *Aspergillus parasiticus* and the expression of the aflatoxin biosynthetic gene, *nor-1*, in infection hyphae. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 185-196.
- Yabe K, Nakamura M, Hamasaki T. 1999. Enzymatic formation of G-group Aflatoxins and Biosynthetic relationship between G- and B-groups aflatoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3867-3872.
- Yen TJ, Gay DA, Pachter JS, Cleveland DW. 1988. Autoregulated changes in stability of polyribosome-bound b-tubulin mRNAs are specified by the first 13 translated nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1224-1235.
- Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich C. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:191-200.
- Yuill E. 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 33: 324-331.



## 1. MEDIOS DE CULTIVO y REACTIVOS

### Agar Dicloran18% Glicerol (DG18) (Pitt & Hocking, 1997)

Glucosa	10g
Peptona	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5g
Glicerol	220g
Agar	15g
Dicloran 0.2% p/v en etanol	2mg
Cloranfenicol	100mg
Agua destilada	1l

### Agar Papa Dextrosa (PDA) (Kirk *et al.*, 2001)

Papa	200g
Agar	20g
Dextrosa	15g
Agua destilada	1l

### Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) (Pitt & Hocking, 1997)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
Czapek concentrante	10ml
Solución metales traza	1ml
Extracto de levadura	5g
Sacarosa	30g
Agar	15g
Agua destilada	1l

### Agar Extracto de Malta (MEA) (Kirk *et al.*, 2001)

Extracto de Malta	20g
Peptona	1g
Glucosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1l

### Agar Glicerol 25% Nitrato (G25N) (Pitt & Hocking, 1997)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.75g
Czapek concentrante	7.5ml
Extracto de levadura	3.7g
Glicerol	250g
Agar	12g
Agua destilada	750ml

### Aspergillus Flavus y Parasiticus Agar (AFPA) (Pitt & Hocking, 1997)

Peptona	10g
Extracto de levadura	20g

Citrato férrico de amónio	0.5g
Cloranfenicol	100mg
Agar	15g
Dicloran 0.2% p/v en etanol	2mg
Agua destilada	1l

**Agar Czapek-Dox (Cz-Dox)** (Bayman & Cotty, 1991a)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5g
NaNO <sub>3</sub>	3g
KClO	5g
FeSO <sub>4</sub>	0.01g
Sacarosa	30g
Agua destilada	1l

**Agar-Sucrosa Extracto de levadura (YES)** (Pitt & Hocking, 1997)

Extracto de levadura	20g
Sacarosa	200g
Agar	15g
Agua destilada	1l

**Agar Avena (OA)** (Kirk *et al.*, 2001)

Avena	20g
Agar	20g
Agua destilada	1l

**Malta Peptona (OA)** (Samson *et al.*, 2000)

Extracto de Malta	10% v/v
Bactopeptona	0.1 p/v

**Reactivo de Erlich** (Fernández Pinto *et al.*, 2001)

4-dimetilaminobenzaldehido	1g
Etanol	75ml
HCL concentrado	25ml

## 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### SECCIÓN 1

**Análisis de la varianza (ANOVA) de la frecuencia de aislamientos de las distintas especies de la sección *Flavi* aisladas de las hojas de plantas de maní nativo y cultivado. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias.**

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	292.753	73.1882	5.38	0.0007
WITHIN	80	1087.29	13.5912		
TOTAL	84	1380.05			

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
AF	4.5294	I
AP	3.2941	I
APII	0.4118	.. I
AT	0.1765	.. I
AC	0.0588	.. I

### SECCIÓN 2

**Prueba de independencia  $\chi^2$  de procedencia de semillas y hojas de maní sobre la producción de esclerocios. Prueba G para tablas de  $4 \times 3$  de procedencia de semillas sobre la producción de esclerocios.**

CASE		VARIABLE			
		L	ND	S	
1	OBSERVED	13	9	8	30
	EXPECTED	15.67	8.57	5.76	
	CELL CHI-SQ	0.46	0.02	0.88	
2	OBSERVED	28	9	3	40
	EXPECTED	20.90	11.43	7.67	
	CELL CHI-SQ	2.41	0.52	2.85	
3	OBSERVED	47	35	36	118
	EXPECTED	61.65	33.71	22.64	
	CELL CHI-SQ	3.48	0.05	7.89	
4	OBSERVED	73	17	0	90
	EXPECTED	29.78	16.29	10.93	
	CELL CHI-SQ	3.51	0.03	10.93	
		161	70	47	278
OVERALL CHI-SQUARE		33.02			
P-VALUE		0.0000			
DEGREES OF FREEDOM		6			
CASES INCLUDED		12			
MISSING CASES		0			

G = 64.8053 FOR TOTAL SET  
 G(WILLIAMS) = 63.4158  
 NON-SIGNIFICANT SUBSETS:

```

1, G-STATISTIC =    3.9528
   ROWS = 1  2  3
   COLS = 1  3
2, G-STATISTIC =    2.8522
   ROWS = 1  2  3
   COLS = 2  3
3, G-STATISTIC =    4.3974
   ROWS = 1  2  4
   COLS = 1  3
4, G-STATISTIC =   12.1967
   ROWS = 2  3  4
   COLS = 1  3
5, G-STATISTIC =    6.5421
   ROWS = 1  2
   COLS = 1  2  3
6, G-STATISTIC =     .1941
   ROWS = 1  3
   COLS = 1  2  3
7, G-STATISTIC =    7.6973
   ROWS = 2  4
   COLS = 1  2  3

```

### Prueba de independencia $\chi^2$ de maní nativo y cultivado sobre la producción de esclerocios.

CASE		VARIABLE		
		A	B	
1	OBSERVED	48	9	57
	EXPECTED	46.23	10.77	
	CELL CHI-SQ	0.07	0.29	
2	OBSERVED	25	8	33
	EXPECTED	26.77	6.23	
	CELL CHI-SQ	0.12	0.50	
		73	17	90
OVERALL CHI-SQUARE		0.97		
P-VALUE		0.3235		
DEGREES OF FREEDOM		1		
CASES INCLUDED 4		MISSING CASES 0		

### Prueba de independencia $\chi^2$ de hojas y semillas de maní cultivado (sitio 15) sobre la producción de esclerocios.

CASE		VARIABLE		
		D	ND	
1	OBSERVED	1	12	13
	EXPECTED	3.50	9.50	
	CELL CHI-SQ	1.79	0.66	
2	OBSERVED	6	7	13
	EXPECTED	3.50	9.50	
	CELL CHI-SQ	1.79	0.66	
		7	19	26
OVERALL CHI-SQUARE		4.89		
P-VALUE		0.0271		
DEGREES OF FREEDOM		1		
CASES INCLUDED 4		MISSING CASES 0		



**Prueba de independencia  $\chi^2$  de procedencia de semillas y hojas de maní sobre la producción de aflatoxinas. Prueba G para tablas de 4 x 3 de procedencia de semillas sobre la producción de aflatoxinas**

CASE		VARIABLE			
		AFB	AMBAS	ND	
1	OBSERVED	17	5	8	30
	EXPECTED	21.31	4.65	4.04	
	CELL CHI-SQ	0.87	0.03	3.88	
2	OBSERVED	30	2	8	40
	EXPECTED	28.41	6.20	5.39	
	CELL CHI-SQ	0.09	2.85	1.27	
3	OBSERVED	70	31	17	118
	EXPECTED	83.80	18.30	15.89	
	CELL CHI-SQ	2.27	8.81	0.08	
4	OBSERVED	90	0	0	90
	EXPECTED	40.48	8.84	7.68	
	CELL CHI-SQ	6.74	8.84	7.68	
		174	38	33	278
OVERALL CHI-SQUARE		41.71			
P-VALUE		0.0000			
DEGREES OF FREEDOM		6			
CASES INCLUDED 12		MISSING CASES 0			

G = 49.5214 FOR TOTAL SET  
 G(WILLIAMS) = 48.3346  
 NON-SIGNIFICANT SUBSETS:  
 1, G-STATISTIC = 8.3222  
 ROWS = 1 2 3 4  
 COLS = 1 3  
 2, G-STATISTIC = 9.3646  
 ROWS = 1 2 3  
 COLS = 1 2 3  
 3, G-STATISTIC = 10.4740  
 ROWS = 2 4  
 COLS = 1 2 3

**Prueba de independencia  $\chi^2$  de maní nativo y cultivado sobre la capacidad toxigénica. Prueba G para tablas de 3 x 2.**

CASE		VARIABLE		
		A	B	
1	OBSERVED	8	52	60
	EXPECTED	22.67	37.33	
	CELL CHI-SQ	9.49	5.76	
2	OBSERVED	23	2	25
	EXPECTED	9.44	15.56	
	CELL CHI-SQ	19.46	11.81	
3	OBSERVED	3	2	5
	EXPECTED	1.89	3.11	
	CELL CHI-SQ	0.65	0.40	
		34	56	90
OVERALL CHI-SQUARE		47.57		

P-VALUE 0.0000  
 DEGREES OF FREEDOM 2  
 CASES INCLUDED 6 MISSING CASES 0

G = 51.5443 FOR TOTAL SET  
 G(WILLIAMS) = 48.3262  
 NON-SIGNIFICANT SUBSETS:  
 1, G-STATISTIC = 5.2553  
 ROWS = 1 3  
 COLS = 1 2  
 2, G-STATISTIC = 2.8919  
 ROWS = 2 3  
 COLS = 1 2

**Prueba de independencia  $\chi^2$  y coeficiente de correlación  $\phi$  por rangos para datos dicotómicos para el estudio de una posible asociación entre la producción de aflatoxinas y producción de estructuras de resistencia de *A. flavus*.**

177	31	208
40	30	70
217	61	278

FISHER EXACT TESTS: LOWER TAIL 0.0000 UPPER TAIL 0.0000 TWO TAILED 0.0000  
 PEARSON'S CHI-SQUARE 23.89 YULE'S Q 0.62  
 P (PEARSON'S) 0.0000 SE (Q) 0.0952  
 YATES' CORRECTED CHI-SQ 22.29 SE (H0: Q = 0) 0.1669  
 P (YATES) 0.0000 YULE'S Y 0.35  
 LOG ODDS RATIO 1.4545 SE (Y) 0.0681  
 SE (LOR) 0.3102 SE (H0: Y = 0) 0.0835  
 SE (H0: LOR = 0) 0.3339 C MAX 0.67  
 CROSS PRODUCT RATIO 4.2823 PHI 0.29  
 CONTINGENCY COEFF 0.28 PHI MAX 0.91

### SECCIÓN 3

**Análisis de la varianza (ANOVA) de la frecuencia de mutantes totales *niaD*, *nirA* y *cnx* de *A. flavus*. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias.**

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	1186.33	593.167	116.16	0.0001
WITHIN	255	1302.10	5.10629		
TOTAL	257	2488.44			

VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
CNX	1.5349	86	1.7469
NIAD	5.4535	86	3.3700
NIRA	0.4651	86	0.9542
TOTAL	2.4845	258	2.2597

CASES INCLUDED 258 MISSING CASES 0

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
NIAD	5.4535	I
CNX	1.5349	.. I
NIRA	0.4651	.... I

**Análisis de la varianza (ANOVA) de la frecuencia de mutantes *niaD*, *nirA* y *cnx* de *A. flavus* de Formosa. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias.**

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	300.368	150.184	42.35	0.0001
WITHIN	111	393.632	3.54623		
TOTAL	113	694.000			

CHI-SQ	DF	P

**Análisis de la varianza (ANOVA) de la frecuencia de mutantes *niaD*, *nirA* y *cnx* de *A. flavus* de Salta. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias.**

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	1736.51	868.257	115.53	0.0005
WITHIN	351	2637.98	7.51562		
TOTAL	353	4374.50			

**Análisis de la varianza (ANOVA) de la frecuencia de mutantes *niaD*, *nirA* y *cnx* de *A. flavus* de Corrientes. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para separación de medias.**

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	2	1186.33	593.167	116.16	0.0001
WITHIN	255	1302.10	5.10629		
TOTAL	257	2488.44			