



# Caracterización de las poblaciones de *Aspergillus* sección *flavi* presentes en trigo y sorgo.

Agustina del Palacio  
2016

Tesis de maestría PEDECIBA

Tutora: Dra. Dinorah Pan  
Co-tutora: Dra. Lina Bettucci

Laboratorio de Micología  
Facultad de Ciencias – Ingeniería  
UdelaR

## Índice

1. Resumen .....	pág. 2
2. Introducción.....	pág. 3
2.1 Trigo y sorgo .....	pág. 3
2.2 Género <i>Aspergillus</i> .....	pág. 6
2.2.1 Ciclo de infección de <i>Aspergillus</i> en los cultivos .....	pág. 8
2.2.2 <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> .....	pág. 10
2.3 Micotoxinas .....	pág. 14
2.3.1 Aflatoxinas .....	pág. 15
2.3.2 Acido ciclopiazónico .....	pág. 18
3. Hipótesis.....	pág. 21
4. Objetivos.....	pág. 21
5. Materiales y métodos.....	pág. 22
5.1 Aislamientos fúngicos .....	pág. 22
5.2 Identificación morfológica de las cepas aisladas .....	pág. 22
5.3 Estudio de la producción de esclerocios .....	pág. 22
5.4 Identificación molecular de las cepas de <i>Aspergillus</i> pertenecientes a la sección <i>Flavi</i> .....	pág. 23
5.5 Análisis de la producción de aflatoxinas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) .....	pág. 25
5.6 Análisis de la producción de ácido ciclopiazónico mediante cromatografía de capa fina (TLC) .....	pág. 26
6. Resultados.....	pág. 27
6.1 Aislamiento e identificación morfológica de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> aisladas .....	pág. 27
6.2 Producción de esclerocios.....	pág. 28
6.3 Identificación molecular.....	pág. 29
6.4 Perfil toxicogénico de las cepas.....	pág. 37
7. Discusión.....	pág. 38
8. Conclusiones.....	pág. 48
9. Bibliografía.....	pág. 49
10. Anexo.....	pág. 58

## **1. Resumen**

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* son uno de los principales contaminantes de granos y pueden colonizar los cultivos en etapas previas a la cosecha o durante el almacenamiento. Las especies pertenecientes al género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati*, sección *Flavi* se encuentran entre las más estudiadas debido a que han sido aisladas de una gran variedad de alimentos en los cuales se las ha implicado con el deterioro de los mismos y/o con la producción de aflatoxinas, reflejando de esta manera su importancia económica. La diversificación de las especies de la sección hace muy dificultosa su identificación con los métodos morfológicos y fisiológicos convencionales, debido a que comparten las características que las definen. A partir de estos antecedentes, el objetivo del presente fue caracterizar la población de *Aspergillus* sección *Flavi* y el nivel de riesgo de contaminación con aflatoxinas y ácido ciclopiazónico presente en granos de trigo y sorgo de nuestro país. En los granos de trigo y sorgo analizados se detectó una colonización por *Aspergillus* del 58% y 14% respectivamente. También se observó una alta prevalencia de la especie *A. flavus* tanto en trigo (45%) como en sorgo (54%). El análisis filogenético realizado a las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas permitió determinar la presencia de cepas pertenecientes a *A. flavus*, y *A. parasiticus*. De las 80 cepas seleccionadas pertenecientes a la sección *Flavi*, 67 (84%) fueron capaces de producir esclerocios, la gran mayoría de las cepas aisladas produjeron esclerocios de tipo L (> 400 µm) mientras que únicamente dos cepas aisladas de sorgo produjeron esclerocios del tipo S (< 400 µm). Dentro de las cepas toxicogénicas las prevalentes fueron las productoras de ACP (25%), seguido de las que producen AFB (12,5%) y AFB y AFG (12,5%). Este trabajo es de gran importancia ya que permite conocer por primera vez la biodiversidad de especies de esta sección y su potencial toxicogénico en granos de nuestro país. La información generada permitirá así aportar al conocimiento de estas especies en cultivos antes no estudiados y poder definir estrategias adecuadas para la prevención y control de la contaminación de los granos por micotoxinas.

## 2. Introducción

### • 2.1 Trigo y Sorgo

En Uruguay, la agricultura extensiva de secano (cerealera y de oleaginosas) ha pasado a tener una presencia generalizada dentro del territorio, aunque sigue presentando una localización fundamentalmente en el Litoral Oeste, sobre todo en los departamentos de Soriano, Colonia y Río Negro, seguida por Flores, donde la proporción de superficie agrícola supera el 20%. (Fig. 1) (DIEA, 2015).

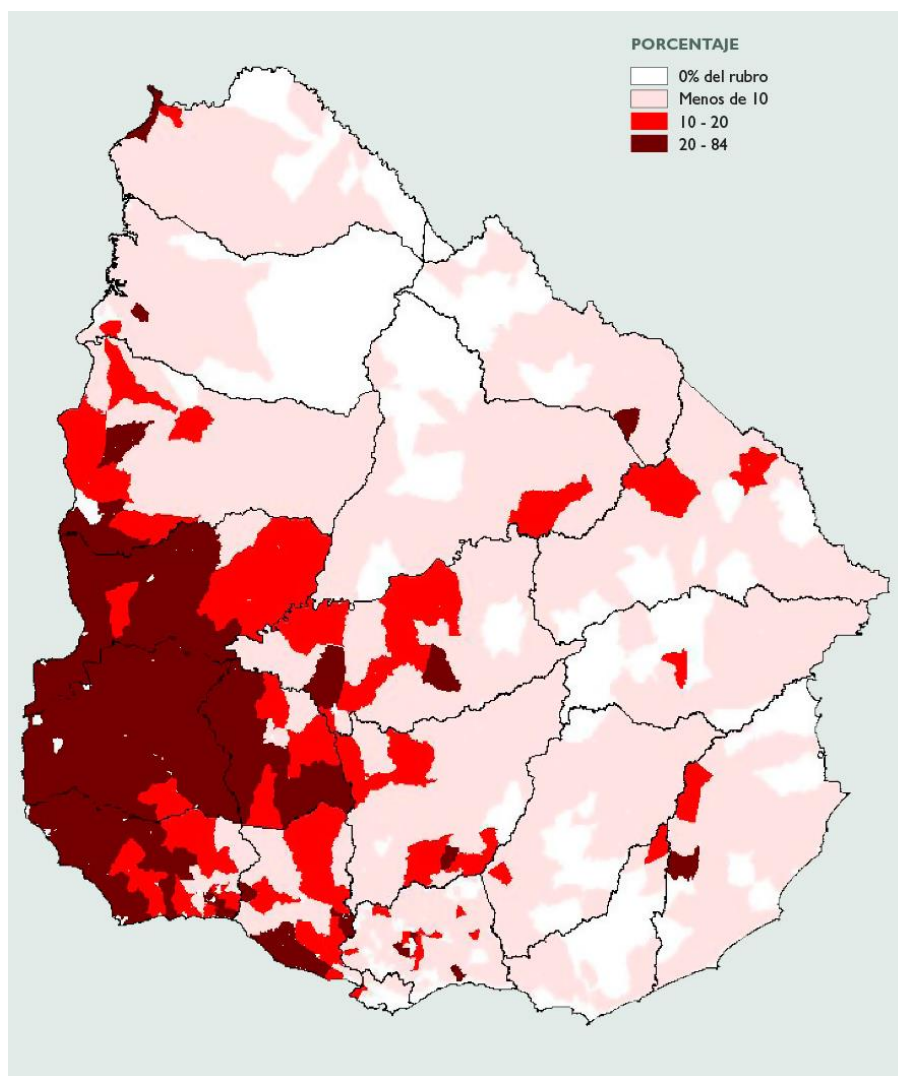


Figura 1. Distribución de las regiones agrícolas destinadas a la siembra de cereales y oleaginosas del Uruguay. Fuente: DIEA, 2015.

El trigo (*Triticum* spp.) es uno de los cereales de mayor distribución mundial calculándose una

producción de 30 gramos por persona por día en el mundo. Si bien el consumo humano es uno de los principales destinos de este grano, una fracción significativa de la producción está destinada a consumo animal y a usos industriales. Más del 90% del trigo cultivado a nivel mundial pertenece a la especie *Triticum aestivum*, al que habitualmente se lo utiliza para productos de panadería o producción de pasta (Khan & Shewry, 2009).

En Uruguay el trigo es uno de los principales cereales cultivados y de significancia económica. La mayor parte de la producción está destinada a la fabricación de harinas para panificadoras y pastelería. El trigo se usa también para fabricar cereales de desayuno y, en menor medida, en la elaboración de cerveza, whisky y alcohol industrial. Los trigos de menor calidad y los subproductos de la molienda y de la elaboración de cervezas y destilados se utilizan como raciones para el ganado. El trigo es un cultivo de invierno en regiones más tropicales y de primavera en regiones más frías, la temperatura óptima para su desarrollo es de 15°C, aunque es capaz de crecer en zonas donde éstas son más elevadas y llegan a superar los 30°C, aunque estas condiciones llegan a afectar la calidad nutricional de los granos (Khan & Shewry, 2009).

El sorgo es conocido desde hace más de 3000 años, existiendo como planta nativa en zonas tropicales de África, pero su cultivo se ha extendido a regiones cálidas y templadas desde 40-45° de latitud Norte a 40-45° de latitud Sur. Actualmente se encuentra en numerosos países de África, Centro y Sud América, sur de Asia y países Mediterráneos (Popescu & Condei, 2014). En nuestro país la importancia del cultivo de sorgo, como parte del sistema de producción, radica en su utilización como grano y forraje para alimento animal. Este cultivo es capaz de tolerar mejor la sequía y el exceso de humedad en el suelo que la mayoría de los cultivos y crece bien bajo una amplia gama de condiciones en el suelo. Requiere un mínimo de 250 mm de agua durante su ciclo para llegar al desarrollo del grano. Si bien tiene la capacidad de sobrellevar períodos de estrés hídrico, para luego volver a crecer en periodos favorables, estas situaciones pueden modificar su comportamiento acelerando o enlenteciendo su maduración. Por ser una especie tropical este grano requiere de temperaturas

elevadas para su desarrollo normal, siendo muy sensible a bajas temperaturas lo que lo define como un cultivo de verano (Mari, 2003).

La intensificación ocurrida en los últimos años en la agricultura de secano en nuestro país ha estado acompañada de la utilización generalizada de la siembra directa, una menor diversificación en la secuencia de los cultivos y cultivares y un incremento en el uso de agroquímicos. Estos factores han inducido cambios en la dinámica de las poblaciones de patógenos y sus problemáticas asociadas (Pereyra & Germán, 2012).

Los granos de cereales, desde su formación en la planta hasta su utilización o consumo final, están expuestos a la colonización por una gran variedad de microorganismos, de los cuales los hongos filamentosos son los más importantes. La colonización fúngica de los granos provoca su deterioro, puede implicar pérdida de viabilidad del grano, pérdida de peso seco, aumento de ácidos grasos, calentamiento del grano y germinación (Jayas et al., 1995). Las condiciones de almacenamiento pueden favorecer el desarrollo de algunas especies fúngicas provenientes del campo o instaladas en los sitios de almacenamiento que alteran la calidad nutricional de los granos y su contaminación con micotoxinas. Se considera a los hongos del almacenamiento como la principal causa del deterioro de los granos almacenados y se ha estimado que entre un 5 y un 10% de la producción mundial de cereales y oleaginosas se pierden durante esta etapa (Jayas et al., 1995; Diaz, 2008). Las condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos y producción de micotoxinas están determinadas principalmente por los niveles de humedad y temperatura, las cuales varían dependiendo de la especie. Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* son uno de los principales contaminantes de granos y aunque están mayormente asociados a condiciones de almacenamiento también pueden colonizar los cultivos en etapas previas a la cosecha (Magnoli et al., 2002; Martins et al., 2003; Bueno et al., 2004; Amusa & Falola, 2004).

- **2.2 Género *Aspergillus***

En 1729, Pier Antonio Micheli, describió el género *Aspergillus* en el libro “Nova Plantarum Genera”. Le dio este nombre debido a que la estructura característica del género se asemejaba a un aspergillum, un instrumento usado por la iglesia católica para rociar el agua bendita. 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. Las especies del género *Aspergillus* son mayoritariamente ubicuas, aislándose de diferentes sustratos y con mayor frecuencia en climas templados y subtropicales entre las latitudes 26° a 35° Norte o Sur del Ecuador (Klich, 2002 a). Especies de este género son causantes de la degradación de productos agrícolas tanto antes como después de la cosecha. También son utilizados a nivel industrial para la producción de enzimas (amilasas) y ácidos orgánicos (ácido cítrico) producidos por un número variado de especies, así como también para la elaboración de productos terapéuticos (Hara et al., 1992; van den Hondel et al., 1992; Ward et al., 1992). Desde el punto de vista ecológico, son importantes degradadores de desechos agrícolas y pueden tener funciones diversas en la solubilización y reciclaje de los nutrientes del suelo (Griffin & Garren, 1976). Frente a insectos patógenos, estos hongos pueden ser utilizados como controladores biológicos (Wadhvani & Sirvastava, 1985; Roberts & Yendol, 1971). Sin embargo, la presencia de *Aspergillus* también trae asociado aspectos negativos, ya que son capaces de producir metabolitos tóxicos (micotoxinas) que pueden afectar la salud de humanos y animales. También algunos de los hongos de este género están asociados a la producción de alergias (aspergilosis broncopulmonar alérgica) en humanos y animales, representando un riesgo potencial para la salud (Rinaldi, 1983)

*Aspergillus* es un género caracterizado morfológicamente, en términos generales, por la formación de conidióforos con estipites largos, de paredes gruesas y ápices usualmente ensanchados formando una vesícula aproximadamente esférica, aunque en algunas especies son más elongadas

Las vesículas del conidióforo presentan fiálides (uniseriados) o métulas y fiálides (biseriados) en toda su superficie o en parte de ella. Los estípites se originan a partir de una célula especializada denominada célula pie que está unida al conidioforo formando una “T” o una “L” en su base. Los conidios se originan en cadenas formando columnas compactas (columnar) o divergentes (radiada), son unicelulares, de pared lisa u ornamentada, hialinos o pigmentados (Figura 2) (Alexopoulos et al., 1996; Pitt & Hocking, 1997).

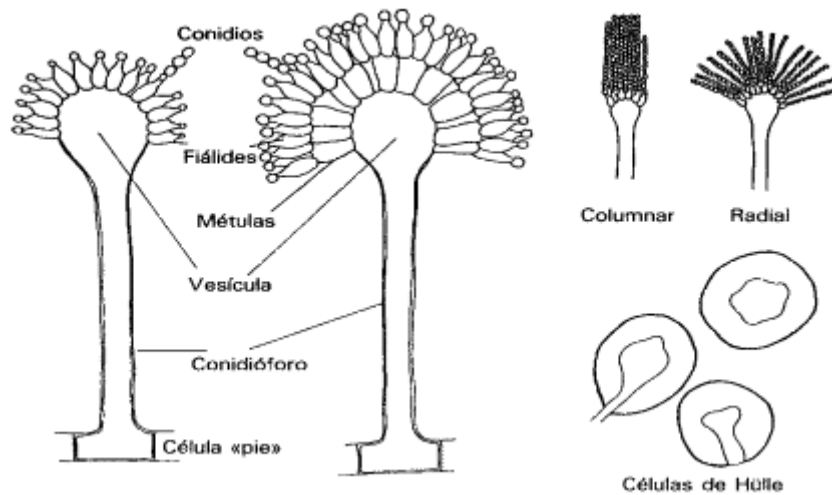


Figura 2. Estructuras características del genero *Aspergillus* (Samson et al., 2000)

Las colonias usualmente crecen rápidamente, en tonos de blanco, amarillo, amarillo amarronado, marrón, negro o distintas tonalidades de verdes según el color de los conidios. Algunas especies pueden producir esclerocios, una masa de hifas compacta, usualmente globosa, que no contienen conidios. Éstos varían en forma, tamaño y color. Funcionan como estructuras de supervivencia que el hongo utiliza para permanecer en el suelo en espera de condiciones favorables para su desarrollo (Wicklow, 1990). Aquellas especies que presentan estadio sexual (teleomorfo) forman una estructura denominada cleistotecio, que son cuerpos fructíferos que no tienen apertura natural y que contienen ascos con ascosporas (esporas sexuales). En algunas de estas especies también se puede evidenciar la presencia de células de paredes gruesas denominadas células de Hülle, (Figura 2).

- **2.2.1 Ciclo de infección de *Aspergillus* en los cultivos**

La propagación de las especies de *Aspergillus* se da a través de los conidios, que son propágulos asexuales, no-móviles que pueden propagarse a través del aire, el suelo y por medio de insectos que las diseminan. Los conidios de *Aspergillus* pueden colonizar los granos presentes en la planta, particularmente cuando se presentan condiciones ambientales tales como altas temperaturas y altos niveles de humedad. Si las condiciones ambientales no fueran las adecuadas para su desarrollo, algunas especies son capaces de formar estructuras de resistencia (esclerocios) que pueden permanecer en el rastrojo por largos periodos de tiempo bajo condiciones climáticas desfavorables. Cuando las condiciones ambientales se modifican y se vuelven favorables para el desarrollo del hongo éste puede comenzar un nuevo ciclo de infección a partir de estos reservorios de inóculo (Figura 3) (Wicklów & Donahue, 1984).

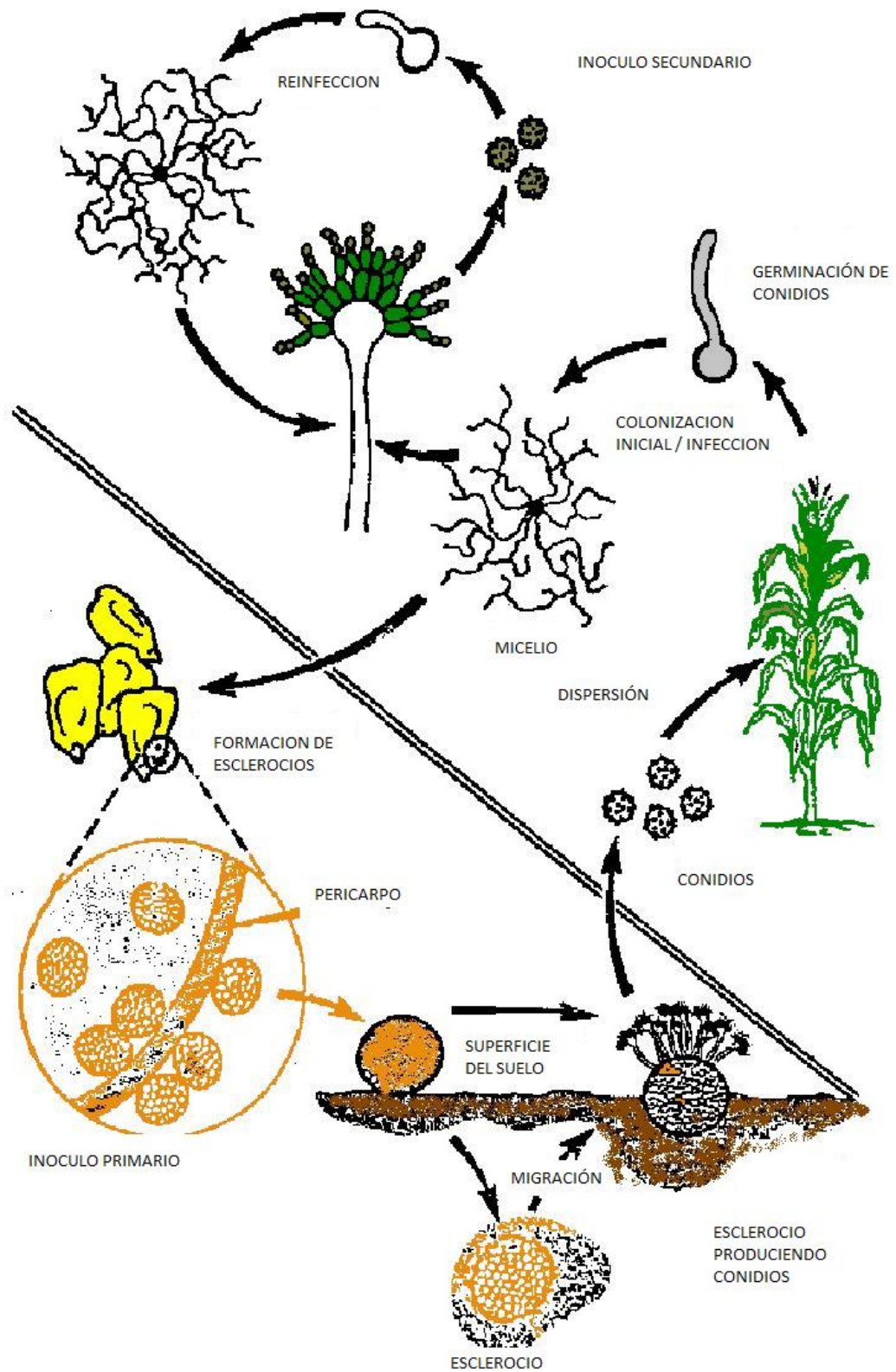


Figura 3. Ciclo de infección de *Aspergillus flavus* en maíz (Adaptado de: Wicklow & Donahue, 1984)

### • 2.2.2 *Aspergillus* sección *Flavi*

Debido a su importancia económica, el género *Aspergillus* es uno de los mejores descritos desde el punto de vista taxonómico. En 1729, Antonio Micheli dio el nombre *Aspergillus* al estado asexual (anamorfo) del hongo, más tarde se descubrió el estado sexual (teleomorfo) para algunas de las especies del género. Raper & Fennell (1965) subdividieron al género en “grupos” basados principalmente en las características culturales y morfológicas, quedando formado por 18 grupos con 132 especies y 18 variedades. En 1986, Gams et al. reemplazaron los grupos por subgéneros y secciones de acuerdo a la nomenclatura establecida por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (CINB). Recientemente se ha dividido al género en 7 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Circumdati* y *Stilobothamnum*) cada uno con dos o más secciones y más de 200 especies (Pitt & Hocking, 1997; Samson et al., 2000; Klich, 2002 b).

Las especies pertenecientes al género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati*, sección *Flavi* se encuentran entre las más estudiadas debido a que han sido aisladas de una gran variedad de alimentos en los cuales se las ha implicado con el deterioro de los mismos y/o con la producción de aflatoxinas, reflejando de esta manera su importancia económica. La sección *Flavi* está compuesta por 7 clados principales con más de 20 especies entre las que se encuentran; *A. avenaceus*, *A. clavatoflavus*, *A. flavus*, *A. leporis*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. subolivaceus*, *A. tamarii*, *A. caelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. alliaceus*, *A. pseudocaelatus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudonomius* y *A. minisclerotigenes*. Además, algunas de estas especies presentan especies ex-tipo, especies que en un primer momento eran consideradas especies diferentes pero que ahora se sabe que son la misma. En el caso de *A. flavus*, tanto *A. oryzae* y *A. effusus* son consideradas como especies ex tipo de *A. flavus* (Varga et al 2009; Soares et al. 2012), por lo que de aquí en más serán consideradas como *A. flavus*. *A. parasiticus* tiene a *A. toxicarius* como especie ex-tipo (Varga et al. 2011).

Las especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Flavi* se caracterizan por presentar micelio generalmente blanco, compuesto por células vegetativas a partir de las cuales nacen los conidióforos y ausencia de estructuras de reproducción sexual. El color de las colonias está dado por las cabezas conidiales de tonalidad verde-amarilla. Los estípites varían desde 400  $\mu\text{m}$  a 800  $\mu\text{m}$  o más de longitud, incoloros o marrón pálido, de paredes rugosas. Las vesículas son esféricas de 20 - 45  $\mu\text{m}$  de diámetro, fértiles sobre tres cuartas partes de su superficie y generalmente presentan fiálides de 7 - 12  $\mu\text{m}$  de longitud. Los conidios son esféricos a elipsoidales, usualmente de 3 - 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, con paredes relativamente delgadas, rugosas o raramente lisas (Pitt & Hocking, 1997).

Otra de las características macroscópicas, relacionada a la capacidad de supervivencia y dispersión, es la presencia de esclerocios. Éstos al comienzo son blancos y luego se vuelven de colores marrón-rojizos o negros, de densidad variable, desde inconspicuos hasta la dominancia de la colonia, suprimiendo prácticamente la producción de conidios. Sobre la base de un criterio morfológico, los hongos pertenecientes a la sección *Flavi* pueden ser divididos en dos tipos de cepas, L y S (Cotty, 1989). Las cepas S se caracterizan por producir numerosos esclerocios con dimensiones menores a 400  $\mu\text{m}$  y conidios en bajo número. Las cepas L son las más frecuentes y se caracterizan por producir esclerocios con tamaños mayores a 400  $\mu\text{m}$  y gran número de conidios. Si bien todas las cepas de la sección *flavi* contribuyen a la biota del suelo, ciertas cepas pueden estar mejor adaptadas que otras. Los esclerocios pequeños y la reducida esporulación de las cepas S podrían implicar una adaptación para infectar y capturar recursos en el suelo, mientras que los esclerocios relativamente grandes, frecuentemente facilitan la infección aérea y la captura de nutrientes de las plantas (Wicklow & Donahue, 1984). También se ha postulado que existe una relación entre el tamaño y el número de los esclerocios producidos con los niveles y tipos de aflatoxinas producidas (Sanchis, 1984). Cepas L producirían únicamente aflatoxinas del tipo B o serían no toxicogénicas, mientras que las cepas de tipo S producirían grandes cantidades de aflatoxinas, algunas únicamente aflatoxinas del tipo B y otras tanto aflatoxinas B como G. Si bien hay autores que sostienen que las cepas S producen niveles

de aflatoxinas mayores en relación a las cepas L (Chang et al., 2001; Novas & Cabral, 2002), hay quienes sostienen que no han observado esta correlación ya que existen cepas que producen aflatoxinas pero no esclerocios y viceversa (Giorni et al., 2007; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006).

La diversificación de las especies de la sección hace muy dificultosa su identificación con los métodos morfológicos y fisiológicos convencionales, debido a que comparten las características que las definen. Es por este motivo que, en la actualidad, 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, que junto con características fisiológicas tales como el crecimiento a distintas temperaturas, son los más utilizados para realizar una rápida determinación aproximada entre especies. Pero para lograr una correcta identificación es necesario determinar el perfil toxicogénico y realizar la secuenciación de distintos genes (Klich & Pitt, 1988; Ito et al., 2001; Peterson et al., 2001). Las regiones espaciadoras internas transcripcionales (ITS) del ADN que codifica para el ARN ribosomal y los genes  $\beta$ -tubulina y calmodulina son algunos de los más estudiados para lograr la identificación de especies dentro de este género.

Las regiones ITS, son regiones no codificantes y variables y son útiles para medir relaciones genealógicas cercanas de hongos, dado que exhiben grandes diferencias interespecíficas (Esteve-Zarzoso et al. 1999). En los hongos, el ADN que codifica para el ARN ribosomal está organizado en unidades que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma. Cada unidad está formada por tres genes, uno que codifica para la subunidad 18S, uno que codifica para la subunidad 5.8S y otro que codifica para la 26S. Estos genes están intercalados por secuencias no codificantes, denominadas ITS1 e ITS2 (Slemmons et al. 2013) (Figura 4.).

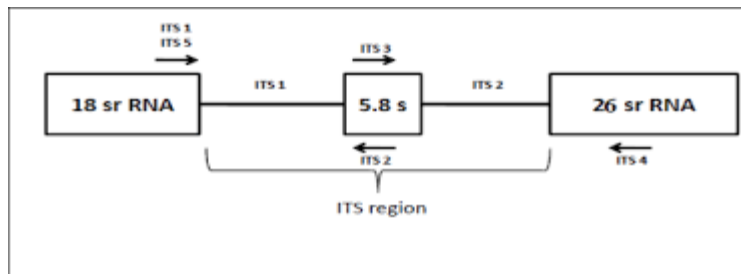


Figura 4. Esquema de la organización génica del ADN que contiene la región codificante del ARN ribosomal.

Los genes pertenecientes a la familia de las tubulinas son los responsables de la síntesis de la unidad estructural de los microtúbulos involucrados en los procesos celulares, tales como la división celular, la movilidad de cilias y flagelos, el transporte intracelular en organismos eucariotas. En general la familia de las tubulinas la componen las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\eta$ . Las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son ubicuas y están presentes en todos los organismos eucariotas. Las  $\alpha$  y  $\beta$  forman heterodímeros cabeza con cola para formar la unidad básica estructural del citoesqueleto del microtúbulo. Las  $\beta$  tubulinas de los hongos son blanco de variados fungicidas, inhibiendo el ensamblado de los microtúbulos y por lo tanto el crecimiento hifal. A pesar de que en la mayoría de los animales existen numerosas copias del gen para la  $\beta$  tubulina, en los hongos puede llegar a existir un único gen (Zhao et al. 2014). Los fragmentos N-terminales de las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  están altamente conservados con variaciones mínimas. La alta tasa de conservación dentro de la familia de las tubulinas implica que las propiedades funcionales de estas proteínas imponen limitaciones enormes a cualquier diversificación de la secuencia, de manera que las mutaciones sólo pueden darse en unas pocas posiciones sin producir un efecto deletéreo. El gen de  $\beta$ -tubulina es uno de los pocos genes que son interrumpidos por uno o varios intrones en una posición conservada en todas las especies investigadas hasta ahora, lo que permite un diseño fácil de los cebadores en torno a esta región. Las características de esta región del genoma han permitido el desarrollo de marcadores evolutivos informativos (Cacciò et al. 2000).

La calmodulina es un polipéptido monomérico ácido altamente conservado que está presente en las células eucariotas de invertebrados, plantas, humanos y hongos. El gen de la

calmodulina codifica para receptores citoplasmáticos de calcio presentes en células no musculares, lo que le permite al calcio mediar respuestas celulares y mantener los niveles de homeostasis en tejidos no musculares. Se ha observado que el complejo  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina es responsable de la activación de numerosas enzimas tales como fosfodiesterasas,  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasas, proteína kinasas y adenilato ciclasas, además de ser un importante regulador del crecimiento celular (Yasui et al., 1995). En especies de *Aspergillus* se ha reportado la importancia del complejo  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina en la fosforilación y desfosforilación de proteínas involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas (Jayashree et al. 2000; Juvvadi & Chivukula, 2006). Los hongos presentan una única copia del gen para la calmodulina compuesto de 5 intrones y 5 exones que se traduce en 149 aminoácidos. Presenta regiones conservadas relacionadas a los sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y a la vez mutaciones puntuales en las regiones no codificantes, lo que permite su utilización como indicador evolutivo (Serra & Peterson, 2007).

- **2.3 Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, altamente tóxicos, producidos por ciertos hongos filamentosos principalmente al final de la fase exponencial o durante la fase estacionaria de crecimiento (Bullerman & Draughon, 1994; Sweeney & Dobson, 1998). Se estima que el 25% de los cultivos mundiales se ven afectados por hongos productores de micotoxinas. Según la FAO, las pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a las micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año. Una gran variedad de hongos son capaces de producir micotoxinas, sin embargo *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son de los géneros productores más importantes (Sidhu, 2002). Existen variadas hipótesis sobre el posible rol ecológico de estos compuestos, una de las hipótesis que se plantea es que los hongos producirían micotoxinas como mecanismo de defensa frente a posibles predadores, esta estrategia habría sido adoptada de las plantas

ya que éstas producirían compuestos con similares características. Otra hipótesis es que la producción de micotoxinas favorecería la colonización del nicho por parte de los hongos, otorgándole una ventaja frente a posibles competidores (Wicklow, 1988).

Son compuestos biológicos activos capaces de causar diversos desordenes clínicos en humanos y animales cuando son ingeridos, además de generar grandes pérdidas a nivel económico. La presencia de micotoxinas en los granos está directamente relacionada al crecimiento fúngico, sin desarrollo de hongos no habrá formación de toxinas. Sin embargo, la existencia de hongos no implica su producción ya que las condiciones pueden no ser adecuadas para su síntesis o las cepas pueden no ser toxicogénicas. En general la síntesis de micotoxinas se asocia a condiciones de estrés, tales como cambios en la temperatura, humedad, aeración o presencia de agentes agresores (Diaz, 2008).

- **2.3.1 Aflatoxinas**

Las aflatoxinas son una de las principales micotoxinas producidas por los hongos del genero *Aspergillus*. La presencia de aflatoxinas en alimentos fue descubierta en 1960 debido al síndrome de la “enfermedad X de los pavos” en Inglaterra. En aquella ocasión más de 100000 pavos, patos y faisanes murieron en pocos meses después de consumir un alimento a base de harina de maní de origen brasilero. Luego de investigaciones interdisciplinarias intensivas, se pudo determinar que la causa del problema había sido el consumo de harina de maní enmohecida. La harina contenía un compuesto tóxico que fue denominado aflatoxina, dado que era producida por *A. flavus* (Alexopoulos et al, 1996).

Las aflatoxinas se forman por condensaciones de unidades de acetato para dar origen a un policétido cíclico, el cual es enzimáticamente modificado a través de una serie de intermediarios. El mecanismo de biosíntesis aceptado para las aflatoxinas se esquematiza en la figura 5 (Steyn, 1980; Bennett & Christensen, 1983; Bhatnagar et al., 1992; Torres et al., 2014). Estudios genéticos

demonstraron que la biosíntesis de aflatoxinas es un proceso altamente complejo gobernado por más de 30 genes agrupados en un cluster en una región de 70 kb del ADN. La regulación de la transcripción es controlada por una proteína codificada por el gen *aflR* (Yu et al., 2004).

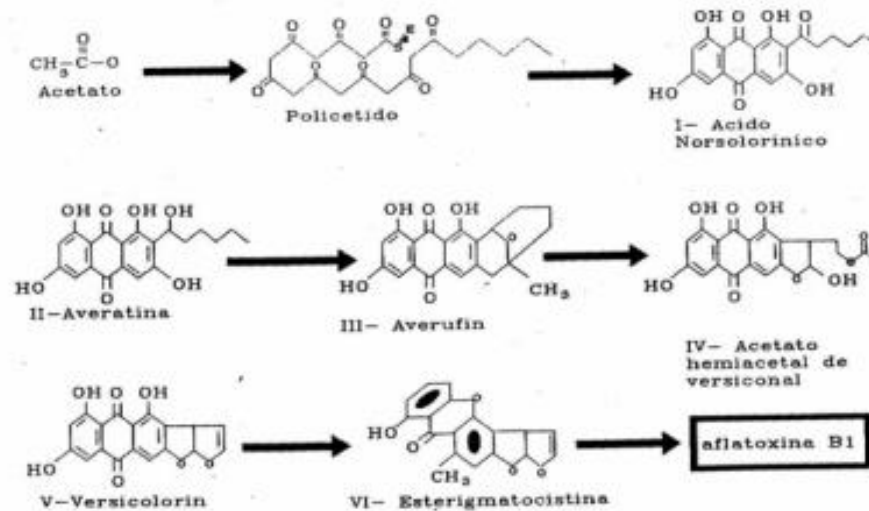


Figura 5. Esquema de la biosíntesis de aflatoxina B1. (Torres et al., 2014)

Las principales aflatoxinas que se presentan naturalmente son cuatro: aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) y aflatoxina G2 (AFG2). Estructuralmente, las aflatoxinas son derivados de las difurano-cumarinas, contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de las aflatoxinas B, o a una lactona en las aflatoxinas G (Figura 6) (Büchi & Rae, 1969). La nomenclatura B y G surge del color emitido (azul/blue o verde/green) cuando son visualizadas bajo luz ultravioleta con una longitud de onda de 365 nm y los subíndices 1 y 2 a los patrones de movilidad de los compuestos en cromatografía de capa fina.

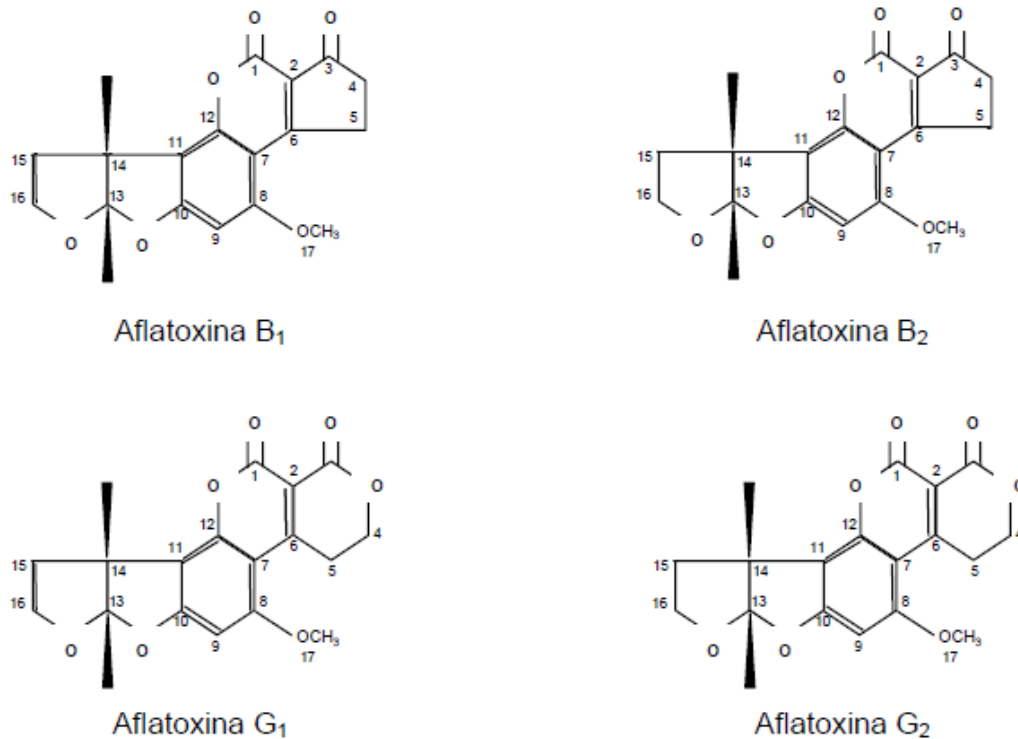


Figura 6. Estructura química de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>

Las aflatoxinas M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) y M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) son los derivados metabólicos resultantes de la hidroxilación del carbono 14 de las AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, respectivamente. Cuando animales y humanos consumen alimentos contaminados con aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, una proporción de alrededor del 1% es hidroxilada en el hígado y excretada en leche como AFM<sub>1</sub> y AFM<sub>2</sub> (Cathey et al., 1994; Sweeney & Dobson, 1998). Estos compuestos presentan menor toxicidad que las moléculas predecesoras, pero son de gran importancia ya que pueden estar presentes en leche y derivados si el animal consume suficiente cantidad de alimento contaminado (Unusan, 2006).

Los daños resultantes del consumo de granos contaminados con aflatoxinas van desde daño agudo al hígado, incluyendo necrosis y hemorragia, hasta cáncer hepático e inmunosupresión. Aunque las aflatoxinas son conocidas más frecuentemente por su capacidad de inducir cáncer hepático a muy bajas dosis, también pueden causar serios problemas en la producción animal ya que ocasionan disminución en la tasa de crecimiento y baja productividad (leche, huevos, etc) (Pier, 1991). Altas

dosis de estas micotoxinas pueden llevar a la muerte de animales susceptibles tales como aves y porcinos (Robens & Richard, 1992). Cabe destacar que AFB1 y AFM1 están clasificadas como carcinógeno grado 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2012). En nuestro país el Reglamento Bromatológico Uruguayo permite 3 µg/kg de aflatoxinas totales en alimentos para niños, 20 µg/kg de aflatoxinas totales en otros alimentos y condimentos y 0.5 µg/kg de AFM1 en leche y productos lácteos. Por su parte el MERCOSUR ha establecido niveles de 0,5 µg/l de AFM1 en leche, 5,0 µg/kg de AFM1 en leche en polvo y 20 µg/kg de aflatoxinas totales en maíz y maní (MERCOSUR, 2006).

Dentro de las especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Flavi* las aflatoxinas son sintetizadas por *A. flavus*, *A. parasiticus* (Codner et al., 1963; Schroeder, 1966), *A. nomius* (Kurtzman et al., 1987), *A. pseudotamarii* (Ito et al., 2001), *A. bombycis* (Peterson et al., 2001), *A. toxicarius* (Murakami, 1971; Murakami et al., 1982; Frisvad et al., 2004) y *A. parvisclerotigenus* (Saito & Tsurota, 1993, Frisvad et al., 2004). *Aspergillus flavus* es productor exclusivo de aflatoxinas del tipo B (Dorner et al., 1984; Klich & Pitt, 1985; Bennett & Papa, 1988; Ito et al., 2001; Ehrlich et al., 2004; Frisvad et al., 2005), mientras que *A. parasiticus*, *A. toxicarius*, *A. nomius* y *A. bombycis* pueden producir tanto aflatoxinas del tipo B como del tipo G (Ehrlich et al., 2004; Frisvad et al., 2005).

- **2.3.2 Acido ciclopiazónico**

El ácido ciclopiazónico (ACP) es una micotoxina producida por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Dorner et al., 1984), con estructura ácido indol-tetrámico (Figura 7). Alguna de las especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* tales como *A. tamarii* y *A. flavus* son capaces de producir esta toxina. El ACP es tóxica para varios animales como ser cerdos, pollos, ratas, perros y conejos (Norred, 1988). También se cree que es el responsable de los síntomas del “envenenamiento de Kodua” caracterizado por depresión e inmovilidad en humanos y ganado que consumieron mijo contaminado (*Paspulum scrobiculatum*) por *A. flavus* y *A. tamarii* en la India (Rao & Husain, 1985).

Este compuesto actúa bloqueando el canal  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPasa del retículo sarcoplasmático de las células musculares (Moncoq et al., 2007).

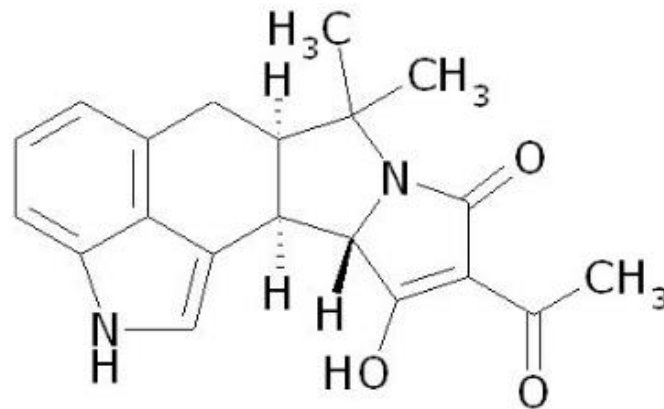


Figura 7. Estructura química del ácido ciclopiazónico

La ocurrencia natural de ACP ha sido reportada en variedad de sustratos tales como maní, maíz, queso, girasol y varios alimentos destinados al consumo animal (Urano 1992; Le Bars, 1990, Ross et al. 1991; Balachandran & Parthasarathy, 1996; Gonçalez et al., 2013). También se constató la acumulación de esta micotoxina en carne y huevos de pollo y en leche de ovejas (Dorner et al. 1994). Los signos clínicos de intoxicación incluyen anorexia, diarrea, fiebre, deshidratación, pérdida de peso, inmovilidad y muerte. El análisis histológico en animales expuestos a ACP mostró diseminación de focos de necrosis en la mayoría de los tejidos del hígado, riñón, páncreas y miocardio (Dorner et al. 1985).

Estos antecedentes confirman que es necesario estudiar la población de *Aspergillus* sección *Flavi* y su potencial toxicogénico con el fin de conocer la biodiversidad y ocurrencia de estas especies en trigo y sorgo de nuestro país, como así también el riesgo de contaminación de estos granos con aflatoxinas y ACP. Al mismo tiempo, debido a la similitud morfológica y a los diferentes perfiles

toxicogénicos que presentan las especies pertenecientes a esta sección, es necesario realizar una correcta identificación de las cepas.

### **3. Hipótesis.**

- Las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en granos de trigo y sorgo, son las mismas indicando una distribución homogénea de las especies.
- Dentro de las especies pertenecientes a la sección *Flavi*, *Aspergillus flavus* es la especie aislada con mayor frecuencia en ambos granos
- Las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en nuestro país son productoras de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y ACP.

### **4. Objetivo general**

- Caracterizar la población de *Aspergillus* sección *Flavi* y el nivel de riesgo de contaminación con aflatoxinas y ACP presente en granos de trigo y sorgo

#### **4.1 Objetivos específicos**

- Aislar cepas de *Aspergillus*, pertenecientes a la sección *Flavi*, de granos de trigo y sorgo
- Identificar morfológica y molecularmente las cepas aisladas
- Establecer si existe relación entre los niveles de producción de toxinas y el tipo de esclerocio producido por la cepa
- Determinar el perfil toxicogénico de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de nuestro país

## **5. Materiales y métodos.**

- **5.1 Aislamientos fúngicos**

Las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* utilizadas en este trabajo fueron aisladas de muestras de trigo y sorgo provenientes de la zona cerealera de nuestro país. Para ello, de cada muestra se seleccionaron 100 granos de trigo y 100 de sorgo y se colocaron en placas de Petri conteniendo medio fresco Agar Papa Dextrosa (APD) y se incubaron a 25°C durante 7 días con ciclos luz/oscuridad de 12 horas. Las colonias emergentes que presentaron características macro y micromorfológicas correspondientes al género *Aspergillus* fueron subcultivadas para su posterior identificación a nivel de especie.

- **5.2 Identificación morfológica de las cepas aisladas**

Las cepas aisladas fueron inoculadas en medio Agar Czapek Extracto de levadura (CYA), a 25°C y a 37 °C; Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Czapek (CZ), y Agar Czapek Extracto de Levadura con 20% Sacarosa (CY20S) a 25 °C. Luego de 7 días de incubación, se determinó el diámetro de la colonia y se examinaron sus características macro y micromorfológicas para su identificación según Klich (2002 b) y Pitt & Hocking (1997).

- **5.3 Análisis de la producción de esclerocios**

La producción de esclerocios fue realizada en base a la metodología descrita por Novas & Cabral (2002). Placas conteniendo medio Agar Czapek-Dox (CZ) fueron inoculadas con micelio perteneciente a cada una de las cepas aisladas e incubadas a 30°C en oscuridad durante 15 días. Para la obtención de los esclerocios se realizó el raspado de la superficie de la placa sobre papel de filtro Whatman N° 2 mientras se lavó con agua-Tween 20 (100 µl tween 20 por litro de agua). Los esclerocios se limpiaron mediante sucesivos enjuagues con agua destilada en un vaso de Bohemia y se dejaron secar al aire libre. Para la determinación de los diámetros, 20 esclerocios de cada cepa

se colocaron en portaobjetos y se midieron bajo microscopio estereoscópico (40x). En base a sus diámetros las cepas fueron clasificadas en “S” (< 400 µm) o “L” (> 400µm).

- **5.4 Identificación molecular de las cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Flavi***

El ADN de las cepas fue extraído según el método de Specht et al. (1982). Los aislamientos se hacen crecer en medio líquido Extracto de levadura Peatona Glucosa (YEED) a 25°C durante 2-3 días en agitación. El micelio se filtra y luego se congela con nitrógeno líquido y se muele con mortero hasta obtener un polvo fino. Se agregan 800 µl de solución de extracción (0,2 M tris HCl (pH 7,5), 1% SDS, 1mM EDTA) por cada 200 mg de micelio, se homogeniza y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. El ADN se extrae primero con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifuga a 12.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante final se precipita con dos volúmenes de etanol 95% en presencia de 0,3 M de AcNa y centrifugando 10 minutos a 13.000 rpm. El precipitado se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en 50 µl de buffer Tris – EDTA 10-1 (10 mM tris Hcl, 1 mM EDTA (pH 8)). Se incuba 30 minutos a 37°C con RNAsa 10 µg/ml final.

La región ITS fue amplificada mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores ITS1 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G e ITS4 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC, según las condiciones descritas por White et al. (1990). Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 µL de Buffer 10x, 5 µL de MgCl (25 mM), 1,25 µL de cada cebador (20mM), 5 µL de dNTP (2,5 mM) y 0,5 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL. Para la amplificación, el ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94°C por 5 minutos. Luego, se llevaron a cabo un total de 35 ciclos de amplificación en un termociclador programable (GeneAmp. PCR system 9700, Perkin-Elmer, USA) donde cada ciclo consistió en 1 minuto de denaturalización a 94°C, 1 minuto a temperatura de hibridación (55°C) y 1 minuto de amplificación a 72 °C. El último ciclo fue seguido de un último

paso de extensión a 72 °C por 10 minutos.

El gen de la calmodulina fue amplificado en un ciclo de PCR con los siguientes pares de cebadores; CMD 5 5'- CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC y CF4 5'- TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC.

Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 µL de Buffer 10x, 5 µL de MgCl (25 mM), 2 µL de cada cebador (10mM), 5 µL de dNTP (2,5 mM) y 0,5 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL. El ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94 °C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de amplificación donde cada uno consistía de un primer paso de denaturalización de 50 segundos a 94 °C, un paso de hibridación de 50 segundos a 58°C y de extensión de 1 minuto a 72 °C. El último ciclo fue seguido de un paso final de extensión a 72 °C por 7 minutos.

Finalmente, para la amplificación del gen de la β-tubulina se utilizó el siguiente par de cebadores; Bt2a 5'- GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC y Bt2b 5'- ACC CTC AGT CTA GTG ACC CTT GGC, según la metodología descrita por Glass & Donaldson, 1995. Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 µL de Buffer 10x, 5 µL de MgCl (25 mM), 1 µL de cada cebador (20mM), 4 µL de dNTP (2,5 mM) y 0,3 µL de Taq polimerasa Thermo Scientific® (5 U/µL) en un volumen final de 50 µL. La amplificación se realizó en las siguientes etapas, denaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificación cada uno con un paso de denaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 56°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Seguido de un paso final de extensión a 72°C por 7 minutos.

Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa (1,5%), conteniendo el colorante GoodView TM. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). Los productos de PCR obtenidos fueron luego enviados a secuenciar a MACROGEN Inc. (Seúl, Korea). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa Seqman (Lasergene, Madison, WI) y comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) usando la herramienta Nucleotide Blast del

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) y del CBS

(<http://www.cbs.knaw.nl/aspergillus/>). A partir de las secuencias obtenidas se construyeron los árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 6.0. (Tamura et al., 2013). Para ello se utilizaron secuencias de los diferentes genes de las especies en estudio almacenadas en la base de datos Gen Bank y el CBS (*A. miniesclerotigenes* CBS 117639; *A. minisclerotigenes* CBS 115635; *A. parvisclerotigenes* CBS 121.62; *A. parasiticus* NRRL 502; *A. parasiticus* CBS 100926; *A. toxicarius* CBS 822.72; *A. flavus* CBS 282.95; *A. flavus* NRRL 458; *A. flavus* CBS 100558; *A. oryzae* CBS 100925; *A. effusus* NRRL 506; *A. caelatus* NRRL 26100; *A. pseudotamarii* NRRL 25517; *A. bombycis* NRRL 26010; *A. nomius* NRRL 3161; *A. coremiiformis* CBS 553.77; *A. muricatus* NRRL 35674; *N. muricatus* CBS 112808). Las secuencias se alinearon utilizando el software MUSCLE (Edgar, 2004), incluido como parte del programa MEGA 6.0. Los árboles filogenéticos se construyeron por Máxima Parsimonia (Hills & Bull 1993) utilizando 1000 repeticiones (bootstrap).

- **5.5 Análisis de la producción de aflatoxinas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

El análisis de la producción de aflatoxinas se realizó según la metodología descrita por Bragulat et al. (2001). Para ello las cepas se incubaron en placas de Petri conteniendo medio AEC a 25°C durante 14 días en oscuridad. Luego, tres discos de agar fueron cortados de cada placa y colocados en un tubo Eppendroff al que se le adicionó 1 ml de metanol. Luego de 1 hora en metanol la solución fue filtrada a través de un un filtro Millipore ( $\varnothing$  0.22 mm) y una alícuota (200  $\mu$ l) fue derivatizada con 700  $\mu$ l de ácido trifluoroacético: ácido acético: agua Mili Q (20:10:70, v/v). La solución derivatizada fue analizada mediante HPLC de fase reversa compuesto por una bomba Shimadzu LC-10ADvp y un detector de fluorescencia RF-10Ax1 (Shimadzu; con una longitud de onda de emisión y excitación de 360 nm y 440 nm, respectivamente). Se utilizó una columna de fase reversa C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m tamaño de partícula; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Germany) conectada a una precolumna Security Guard (8 x 4 mm i.d., 5  $\mu$ m tamaño de

partícula; Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Germany). La fase móvil utilizada fue agua Milli Q: metanol: acetonitrilo (4:1:1, v/v/v) a un flujo de 1.5 ml/ min. El volumen de inyección fue de 20 µl. El límite de detección fue de 1 µg/kg para AFB1 y AFG1 y de 0.8 µg/kg para AFB2 y AFG2. Para la cuantificación de AFB1 se realizó una curva de calibración a partir de soluciones estándar de concentraciones de 50, 100 y 250 µg/kg.

- **5.6 Análisis de la producción de ACP mediante TLC**

Para la determinación de la producción de ACP se siguió la metodología propuesta por Bragulat et al. (2001). Para ello las cepas aisladas fueron inoculadas en un único punto en el centro de una placa de Petri (Ø 6 cm) conteniendo medio CZ y fueron incubadas a 25 °C durante 14 días en oscuridad. Tres discos de agar fueron extraídos de distintas zonas de la colonia y colocados en un tubo Eppendorf al que se le adicionó 1 ml de metanol para la extracción del ACP. El tubo fue centrifugado a 12,000 rpm durante 13 minutos. Se colectó la solución en un tubo limpio y se llevó a sequedad, luego se resuspendió el residuo en metanol para su posterior análisis mediante TLC. La placa de sílica gel (Macherey-Nagel) fue previamente sensibilizada con una solución conteniendo ácido oxálico- etanol 2% durante 10 minutos y posteriormente calentada a 80°C durante 1 hora. La fase móvil utilizada fue benzeno: ácido acético : metanol (90:5:7) y se sembraron 5µl de cada muestra junto con el estándar. El ACP fue visualizado luego de un tratamiento de las placas con p-dimethylaminobenzaldehido al 1% en 75 ml de etanol y 25 ml de ácido clorhídrico (Horn & Dorner, 1999). El límite de detección utilizado fue de 1,5 µg/kg.

## **6. Resultados**

### **• 6.1 Aislamiento e identificación morfológica de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas**

A partir de las muestras analizadas se determinó que el 58% de las muestras de trigo y el 14% de las de sorgo presentaron infección con especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Flavi*. Se obtuvieron un total de 80 aislamientos, 40 provenientes de trigo y 40 de sorgo.

Los aislamientos presentaron cabezas conidiales radiadas, vesículas esféricas predominantemente uniseriadas, estípites y conidios de leves a muy rugosos (Figura 8). Los conidios fueron de forma elipsoidal/globosos, de coloración verde olivácea y el micelio de coloración blanca. En base a estas características morfológicas y a las medidas de crecimiento en los distintos medios de cultivo utilizados, todas las cepas fueron identificadas dentro de la sección *Flavi* como *Aspergillus flavus* (Klich 2002). En el anexo se presentan los resultados obtenidos de los crecimientos a diferentes temperaturas en diferentes medios de cultivo.

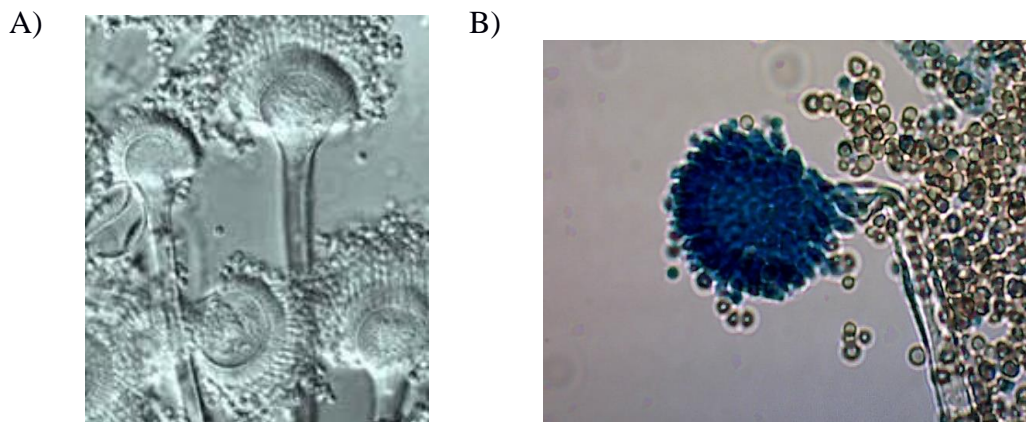


Figura 8. Conidióforos biseriados (A) y uniseriados (B) de *Aspergillus flavus*

## • 6. 2 Producción de esclerocios

Las cepas fueron caracterizadas en base a la presencia, tamaño y forma de los esclerocios. Del total de las cepas aisladas 64 (80%) fueron productoras de esclerocios cuando fueron incubadas en medio CZ. Tanto en el trigo como en el sorgo se evidenció la predominancia de cepas productoras de esclerocios tipo L ( $> 400 \mu\text{m}$ ), y ninguna de las cepas aisladas de trigo fueron productoras de esclerocios del tipo S ( $< 400 \mu\text{m}$ ), existiendo 2 (5%) cepas S aisladas de sorgo (Tabla 1). Todos los esclerocios producidos fueron predominantemente de forma elipsoidal y tonalidad marrón (Figura 9).

Tabla 1. Porcentaje de cepas no productoras y productoras de esclerocios del tipo L y S presentes en trigo y sorgo.

	Cepas sin esclerocios (%)	Cepas del tipo L (%)	Cepas del tipo S (%)
Trigo	20	80	-
Sorgo	20	75	5

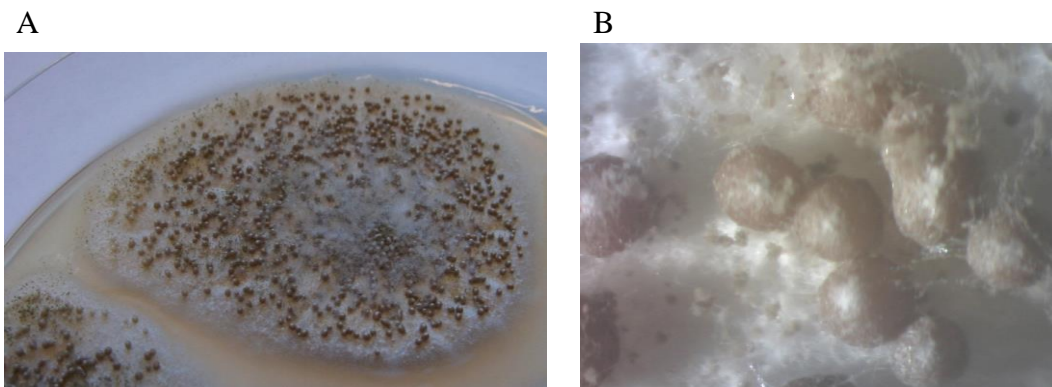


Figura 9. Esclerocios producidos por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* (A) esclerocios en cultivo (B) esclerocios vistos bajo lupa

A los 35 aislamientos de trigo y a los 32 aislamientos de sorgo, capaces de producir esclerocios, se les evaluó también la cantidad de esclerocios producidos, se determinó si éstas producían menos de 20, entre 21 y 25 y más de 25 esclerocios (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de cepas de *Aspergillus* aisladas de trigo y sorgo capaces de producir esclerocios

	Número de esclerocios		
	1 - 20	21 - 25	> 25
TRIGO	11,4%	20%	68,6%
SORGO	6,25 %	18,75 %	75 %

Se evidenció que la mayoría de los aislamientos producen esclerocios en un número mayor a 25, esto fue observado tanto en los aislamientos de trigo como de sorgo.

### • 6.3 *Identificación molecular*

Para la identificación molecular, los aislamientos fueron primero agrupados en base al sustrato de donde fueron aisladas, el tipo de esclerocio producido y los perfiles toxicogénicos, para luego seleccionar cepas representativas de cada grupo para su identificación mediante secuenciación de la región ITS, calmodulina y  $\beta$ -tubulina. Se utilizaron un total de 22 aislamientos, 11 obtenidos de trigo y 11 de sorgo. En la tabla 3 se esquematizan las características que presentaban los aislamientos utilizados.

Tabla 3. Características de los aislamientos seleccionados para la identificación molecular.

	AISLAMIENTO	ESCLEROCIOS		MICOTOXINAS		
		S	L	NO PRODUCTORA	AFLATOXINA	ACP
TRIGO	1;4;5;14;15;19	-	X	X	-	-
	3;11;13	-	X	-	X	X
	10;17	-	X	-	-	X
SORGO	42	X	-	-	X	X
	43	X	-	X	-	-
	44; 49; 59; 60; 61; 63	-	X	X	-	-
	45; 57; 62	-	X	-	-	X

Dado que algunos aislamientos presentaron similitudes del 100% en la secuencias de los tres genes analizados, para la construcción de los árboles filogenéticos éstas se agruparon bajo un único aislamiento representante, estas agrupaciones se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Aislamientos seleccionados como representantes y aislamientos representados.

Aislamientos representantes	Aislamientos representados
3	3; 11; 43 y 57
4	4; 5; 13; 14; 15; 19; 44; 49; 59 y 61

A partir del árbol filogenético realizado en base a la secuencia de la región ITS de las cepas, se pudo determinar que todas las cepas estudiadas pertenecieron al clado de *A. flavus*. El valor de bootstrap obtenido para el nodo que agrupó a todas estas especies junto con las cepas estudiadas fue de 73 (Figura 10).

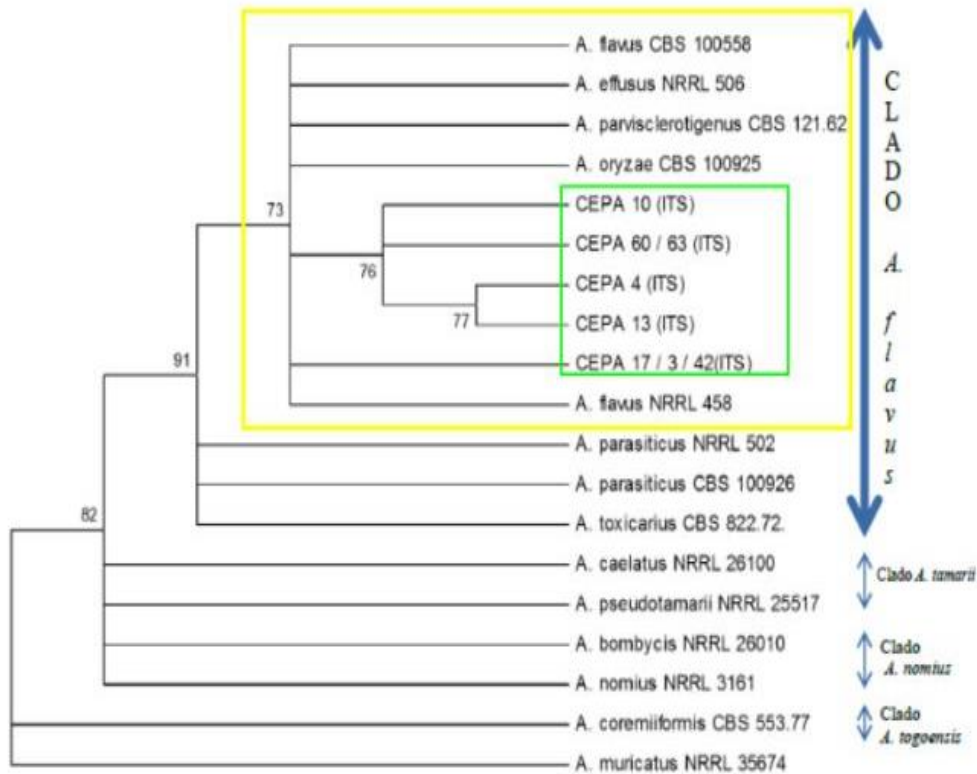


Figura 10. Árbol filogenético de máxima parsimonia construido en base a la secuencia de la región ITS de especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. En los nodos se indican los valores de bootstrap; solo se consideraron valores mayores a 70%. Se resaltan los aislamientos el trabajo y el nodo en el que están agrupados.

El análisis filogenético en base al gen de la  $\beta$ -tubulina para las cepas estudiadas también permitió identificar a las cepas como pertenecientes al clado *A. flavus* con un valor de bootstrap de 98% (Figura 11). Debido a que entre las cepas aisladas hubo una similitud del 100% en las secuencias, se seleccionó una única de éstas como representante del total, y se la mencionó CEPA \* en la construcción del árbol.

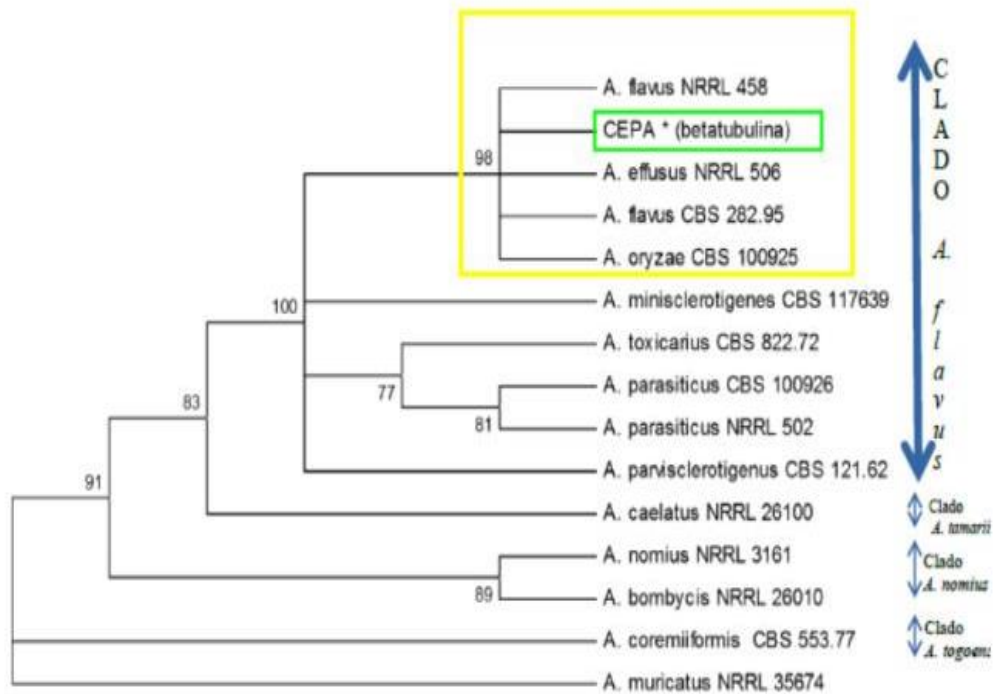


Figura 11. Árbol filogenético de máxima parsimonia en base a la secuencia del gen de la  $\beta$ -tubulina de especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. Los valores de bootstrap obtenidos se indican en cada nodo, se consideraron únicamente valores superiores a 70%. (\*) secuencia representante de las cepas aisladas. Se resaltan los aislamientos el trabajo y el nodo en el que están agrupados.

A partir del análisis del gen de la calmodulina se observó que el total de las cepas estudiadas pertenecieron al clado *A. flavus* con el que agruparon con un valor de bootstrap de 88%. Sin embargo, dentro del clado *A. flavus* las cepas presentaron diferentes agrupamientos. Los aislamientos que fueron identificados como *A. flavus* forman tres sub-grupos, uno con los aislamientos que agruparon junto a *A. oryzae*, otro sub-grupo de los aislamientos que se agruparon con *A. flavus* y finalmente un grupo en el que la cepa de referencia es *A. effusus*. Por otro lado la cepa 45 fue identificada como *A. parasiticus*. También hubieron cepas que no pudieron ser agrupadas a ninguna cepa de referencia

quedando identificadas como pertenecientes al clado *A. flavus* (cepa 4, 42 y 60) (Figura 12).

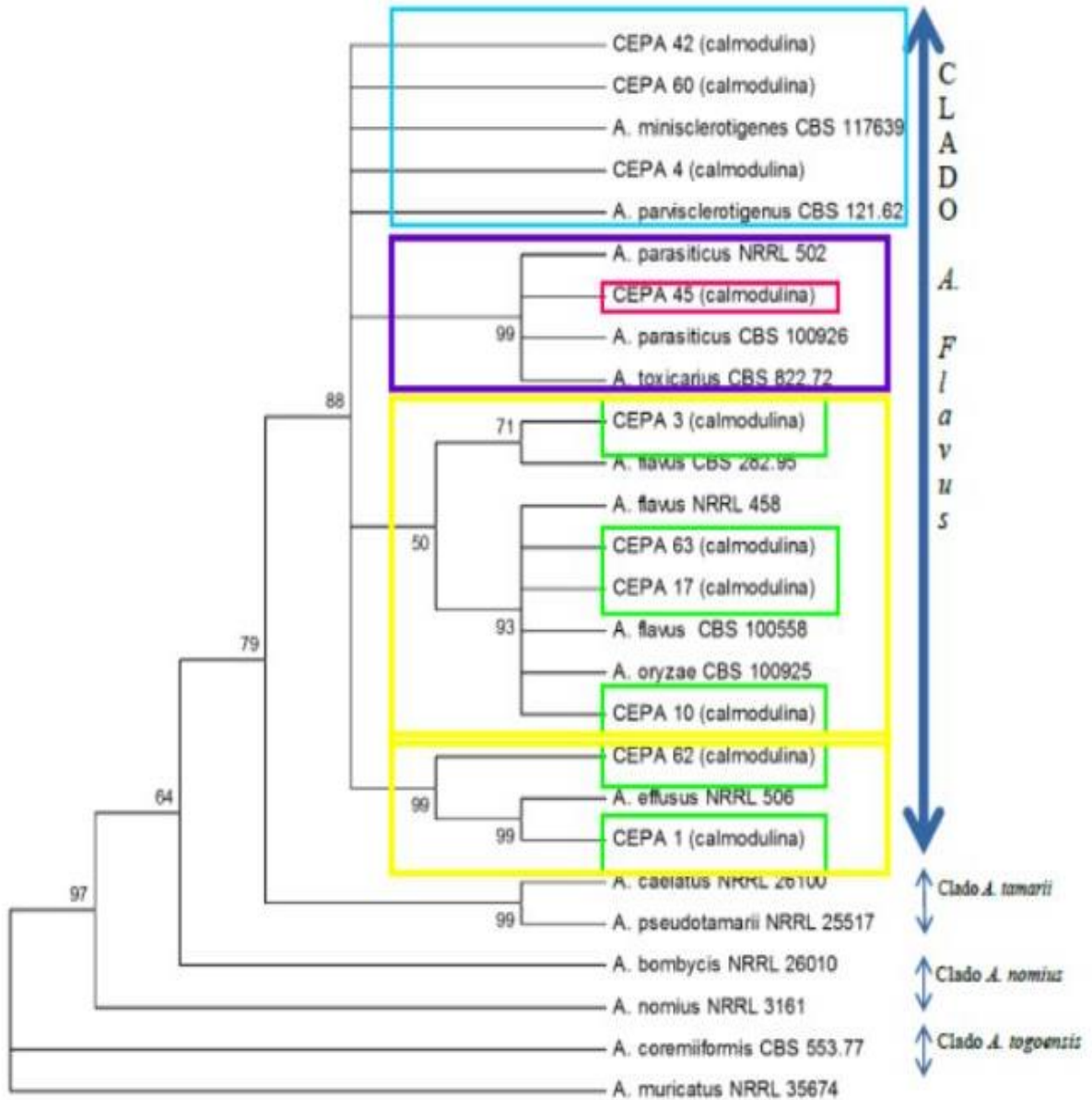


Figura 12. Árbol filogenético de máxima parsimonia en base a la secuencia del gen de la calmodulina de especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. Los valores de bootstrap obtenidos se indican en cada nodo, se consideraron únicamente valores superiores al 50 %. Se resaltan los aislamientos el trabajo y el nodo en el que están agrupados.

Cuando se realizó el análisis de los tres genes concatenados el agrupamiento obtenido fue concordante con la identificación realizada con los genes de forma individual. Se constató una vez más, que las cepas correspondían a las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. El árbol filogenético obtenido tampoco permitió en esta ocasión resolver la identificación de las cepas 4 (Figura 13).

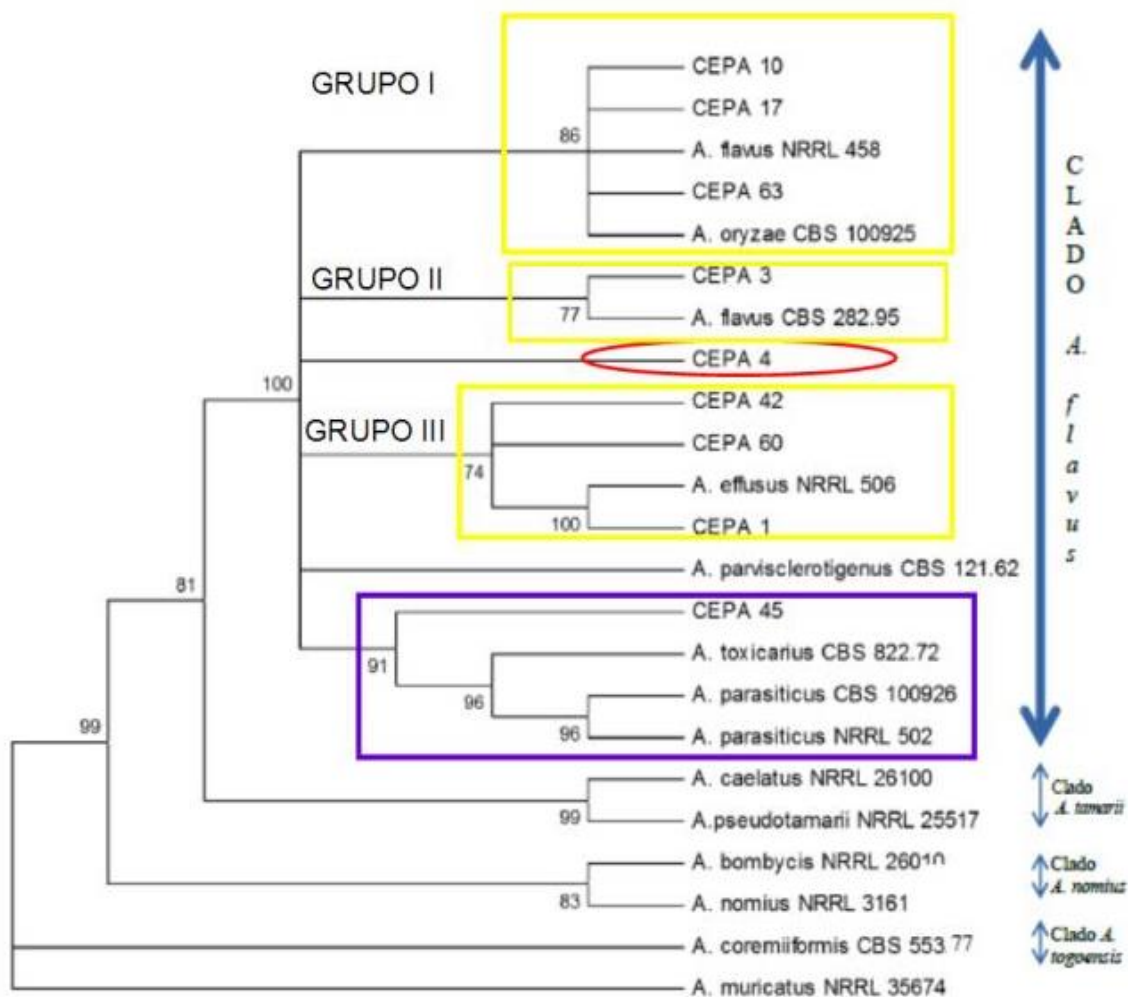


Figura 13. Árbol filogenético de máxima parsimonia en base a la secuencia concatenada de los genes ITS,  $\beta$ -tubulina Y calmodulina de especies de *Aspergillus* sección *Flavi*. Los números sobre las ramas indican los valores de bootstrap, solo se consideraron valores superiores al 70%. Se resaltan nodos en el que están agrupados los aislamientos de este trabajo.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el 45 % de los aislamientos de trigo pertenecieron a la especie *A. flavus*. Dentro de esta especie se encontraron tres sub-grupos, uno conformado por las especies *A. flavus* NRRL 458 y *A. oryzae* CBS 100925 (Grupo I) con el que se agrupó el 18% de las cepas de *A. flavus*, el 9% se agruparon con *A. effusus* NRRL 506 (Grupo III) y el 18% se agrupó con *A. flavus* CBS 282.95 (Grupo II). El 55% restante perteneció al clado *A. flavus* (Figura 13).

Por otro lado el 54% de los aislamientos obtenidos del sorgo pertenecieron a la especie *A. flavus*, aquí se observó también la presencia de los tres sub-grupos en los que el 9% de las cepas se agruparon con *A. flavus* NRRL 458 y *A. oryzae* CBS 100925 (Grupo I), el 27% a *A. effusus* NRRL 506 (Grupo III) y el 18% con *A. flavus* CBS 282.95 (Grupo II). También se pudo determinar la presencia de cepas pertenecientes a la especie *A. parasiticus* (9%) y el 37% de las cepas quedaron agrupadas dentro del clado *A. Flavus* (Figura 13).

Dado que la mayor variabilidad génica se observó en el estudio de la secuencia del gen de la calmodulina, se realizó el análisis de las secuencias para las cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie (cepas 4). Dado el alto grado de similitud de las secuencias de estas cepas con la cepa de referencia *A. flavus* CBS 282.95 se realizó la comparación de las mismas. Este análisis evidenció la presencia de un cambio de base (guanina por timina) en la posición 590 del gen (Figura 15). Sin embargo este cambio de base no modifica el aminoácido para el cual codifica.

```

                                     gcatgctgttatgttgggtggttatgggttcagg -601
taccgtggacctgaagttgccaccactaaggaccgctaacccgaatattcgcttgcctcaagcttctctgtatgaatgaatggcggggtgccacgctgcc -501
tcgccagcggctggatgtgtgtaaatctactccgtacaagacatgatacatatgaacatggaagatatacttagaacaggacactagtgacagactctc -401
tatttgatgatcttaataagcgcaaaatcttcacccgtaggctacagcattcaagagaagaaatgattccagagagctgaagaaagagatcgggcagtgcc -301
ttgaccttagccattccattctctcttggaggggcctcggagcatttatggctagggcgggtcacgttttggaccgcttctgtgaggegetcagctc -201
tgtggctggcgggctggccatttttatgattgaagtaagtcgggtcgggttccccctaaacaacgcgcctcttcccaacctccccccaccactataca -101
cgcggtcactcttgaacctccccctattctcagctcttggatcttttattccctcccatattttatcactcacttcttccactcctccacattccacc -1
ATGgtatgccattcttatttccaccgtgctcagttgtgtttaaaacccccttctgggggttagatggcctggcattctgaacgaaattgtctgacagcg 100
M                                     INTRON1                                     1

categtctagGCCGACTCTTTGACTGAAGAACAGGCTCCGACTACAAGGAGCCCTTCTCCCTATTTCgtaagtagttatcgtegttcgtgaaaattgtgt 200
      A D S L T E E Q V S E Y K E A F S L F                                     20

gtgttagtcgctatgatttgaacacaagctgacttggctttcttgggtttccctatagGACAAGGACGGTGATGgttagtacagtttattttatcaatct 300
      INTRON2                                     D K D G D                                     25

cccatcaaatcgatcaaatatgtttttagccgcataattttaccagttctctgttcgatcgctgaagcttggcattgatgaattgacttgatatgcag 400
                                     INTRON3

GCCAGATCACCCACCAAGGACTTGGGCACTGTGATGCGCTCTCTGGGCCAAAACCCCTCTGAGTCCGAACTCCAGGACATGATTAACGAGGTTGACGCCGA 500
G Q I T T K E L G T V M R S L G Q N P S E S E L Q D M I N E V D A D                                     59
                                     ↓
CAACAATGGCACCATTTGACTTCCCTGgttacgagacggcttccgtacgattcataaatgaaatagctgttaatgttcaaatagAGTTCCTGAACGATGATGG 600
N N G T I D F P                                     INTRON4                                     E F T P M M                                     73

CGAGAAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTCAAGGTTTTTCGACCGCGATAACAACGGCTTCATCTCCGCTGCCGAATTGCG 700
A R K M K D T D S E E E I R E A F K V F D R D N N G F I S A A E L R                                     107

TCACGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTTACCAGATGACGAAGTTGATGAGATGATCCCGAGGGCGGATCAGGATGGTGACGGCCGGATTGACTgtacg 800
H V M T S I G E K L T D D E V D E M I R E A D Q D G D G R I D                                     138

tttcggaagccccccagaccattggggctgtaaaaaatgggtgatactgaccgatttttagACAACGAGTTTGTCCAGCTCATGATGCAAAAATAAagegc 900
      INTRON5                                     Y N E F V Q L M M Q K Stop                                     149

tacctctctgtatatacccccaattgatagcgaaaatgagtgagagtaagaatcatattcactctgtctcattccccgcttctgctattgctttgtagtc 1000
tactgagtcggacatccgctgtgatggcagtcggcgtgcgtaccgttttaagcgttgccttttttggcggatgaatgcagttggatggatttagacgg 1100
agccagacgaattgagatgatgaggtggaatctagaaaaaccgcaatgtctcttggtttggcatgaccacttttggcttgcatttctataccgcttttcc 1200
tttgcctctctctactactattgacggttatcatacaccceatcagggtctctgattttctgggcttaggctcttccatccccgtagcaggtttcaa 1300
acagctgcacataaaaaatcaacaagggccctttgcataccccgtattgctttatogtttccctacgttttgctagacataggctgttatattcgatgtc 1400
ttgaggagtttctaaattctaatgagaatcttactagagaccattattatccgtaagctgtaacgttccacaaccttttagcggttgaaatcaaaaaat 1500
ttccatgaattgctcggccatcaactccagcttccgggtcggggcttctactctgtgtccactctctgtgacattggttagagggttggcgtgctttt 1600
tggctccctagctgctcaactttcgaattgctcttttggcttctctaccagatctt                                     1657

```

Figura 14. Secuencia del gen de la calmodulina de *A. oryzae* en la que se resalta el codón que presenta la mutación

encontrada en el grupo de cepas 4 y con una flecha se indica la base mutada; Fuente: Yasui et al. 1995.

En la tabla 5 se muestra un fragmento de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de las cepas 4 y la secuencia de la cepa de referencia de *A. flavus* CBS 282.95, donde se puede observar la mutación encontrada y se muestra como esta no genera un cambio aminoacídico.

Tabla 5. Comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de la cepa 4 y *A. flavus* CBS 282.95

	Secuencia nucleotídica	Secuencia aminoácida
Cepa 4	TTCAAATAGAGTTCCTTACGATGATGGCGA	EFLTMMA
<i>A. flavus</i> CBS 282.95	TTCAAATAGAGTTCCTGACGATGATGGCGA	EFLTMMA

En base a la identificación realizada mediante métodos moleculares se logró determinar la presencia de cepas pertenecientes a las siguientes especies; *A. flavus*, *A. parasiticus* y *Aspergillus* del clado *flavus*. En la tabla 6 se muestran las medidas de crecimiento que presentaron las cepas identificadas molecularmente en los medios utilizados para la identificación morfológica según la clave taxonómica de Klich 2002.

Tabla 6. Crecimiento a diferentes temperaturas y medios de cultivo para las distintas especies de *Aspergillus*

	CZ 25°C (mm)	CYA 25°C (mm)	CYA 37 °C (mm)	MEA 25°C (mm)	CY20S 25°C (mm)
<i>A. flavus</i> (Grupo I)	33	53	63	53	64
<i>A. flavus</i> (Grupo II)	30	57	55	56	61
<i>A. flavus</i> (Grupo III)	33	60	61	53	66
<i>A. parasiticus</i>	42	55	62	52	54
<i>Aspergillus</i> clado <i>flavus</i>	33	58	55	55	65

En base a las velocidades de crecimiento en los distintos medios de cultivo utilizados para su identificación, no se pudieron observar diferencias que permitieran identificar las diferentes especies por este método.

#### • 6. 4 Perfil toxicogénico de las cepas

En base a la producción de aflatoxinas las cepas se pudieron agrupar en 9 quimiotipos

diferentes; en la tabla 7 se indican cuáles son los distintos quimiotipos encontrados y se muestra el porcentaje de cepas pertenecientes a cada uno.

Tabla 7. Porcentaje de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* pertenecientes a los diferentes quimiotipos

	Q I: AFB1 >AFB2 y ACP	Q II: AFB1 <AFB2 y ACP	Q III: AFB	Q IV: ACP	Q V: no productora	Q VI: AFB, AFG y ACP	Q VII: AFB y AFG	Q VIII: AFB1 y ACP	Q IX: AFG
TRIGO	2,5%	-	7,5%	12,5 %	55%	5%	7,5%	7,5%	2,5%
SORGO	5%	-	5%	12,5 %	65%	2,5%	5%	2,5%	2,5%

Q: quimiotipo

No se observó una distribución diferencial de quimiotipos en los sustratos analizados y en ambos fue prevalente la presencia de aislamientos no productores de toxinas.

Si consideramos la producción de aflatoxinas totales, estas fueron producidas por 32,5% de cepas aisladas de trigo y por 22,5% de las cepas aisladas de sorgo. En relación al ACP, esta toxina fue producida por un 27,5 % de los aislamientos de trigo y 22,5% de sorgo. Considerando el total de las cepas analizadas, el 64% de las cepas fueron no toxicogénicas. Entre las cepas que fueron capaces de producir toxinas, el 25% fueron productoras de AFB1 y ACP, el 12% productoras de AFB2 y AFG2 y el 9% capaces de producir AFG1. Se cuantificaron además los niveles de AFB1 producidos por las cepas aisladas (Tabla 8).

Tabla 8. Niveles de AFB1 producidos por las cepas de *Aspergillus* capaces de producir dicha toxina.

AFB1 (µg/kg)	Número de aislamientos	Porcentaje (%)
1 - 1000	5	25
1001 - 5000	6	30
5001 - 10.000	3	15
10.001 – 15.000	3	15
> 15.000	3	15

Los niveles de producción de toxinas encontrado en los aislamientos fueron variados, la mitad fueron capaces de producir AFB1 en niveles inferiores a los 5000 µg/kg y la mitad produjo niveles superiores, por lo que podemos decir que los aislamientos encontrados fueron variados en este aspecto.

En la Tabla 9 se muestran los perfiles toxicogénicos que presentaron las cepas identificadas como *A. flavus*, pertenecientes a cada uno de los tres sub-grupos, *A. parasiticus*, y las pertenecientes al clado *Aspergillus flavus*.

Tabla 9. Perfiles toxicogénicos que presentaron las diferentes especies aisladas

	Q I: AFB1 > AF B2 y ACP	Q II : AFB1 < AFB2 y ACP	Q III: AFB	Q IV: ACP	Q V: no productora	Q VI: AFB, AFG y ACP	Q VII: AFB y AFG	Q VIII: AFB1 y ACP	Q IX: AFG
<i>A. flavus</i> (Grupo I)	-	-	-	25%	75 %	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> (Grupo II)	-	-	-	67%	33%	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> (Grupo III)	-	-	-	25%	-	25 %	-	50 %	-
<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	100%	-	-	-	-
Clado <i>A.</i> <i>flavus</i>	-	-	-	-	90 %	10 %	-	-	-

Q: quimirotipo

La mayor variedad de perfiles toxicogénicos se observaron en los aislamientos

identificados como *A. flavus*, principalmente en los pertenecientes al Grupo III.

En cuanto a la relación entre el tipo de esclerocio y la producción de micotoxinas se pudo observar que una de las dos cepas S (cepa 42) fue capaz de producir aflatoxinas con niveles mayores a 15.000 µg/kg de micelio y produjo una gran cantidad de esclerocios. Mientras que la otra cepa S no fue productora de aflatoxinas pero si fue capaz de generar un elevado número de esclerocios. Por otro lado, del total de cepas del tipo L aisladas 66% no produjeron aflatoxinas ni ACP. Lo mismo se observó en relación a los aislamientos que no produjeron esclerocios donde el 77% de los aislamientos no produjeron aflatoxinas ni ACP.

## 7. Discusión

En nuestro país el sorgo es utilizado principalmente para la alimentación animal, siendo muy común la práctica de silo de grano húmedo, utilizándose como sustituto de pasturas en épocas de escasez, principalmente para el ganado lechero. Por otra parte, el principal destino del trigo es para el consumo humano, para la producción de harina para productos panificados. La presencia de hongos pertenecientes a la sección *Flavi* de *Aspergillus* plantea una alerta importante debido a su gran potencial toxicogénico y a la posibilidad de que estas toxinas sean transmitidas a la leche humana y animal a través de la metabolización de las aflatoxinas del tipo B en las de tipo M.

En los granos de trigo y sorgo analizados se detectó una colonización por hongos pertenecientes al género *Aspergillus* del 58% y 14%, respectivamente. Si bien existen varios estudios que señalan la presencia de especies de *Aspergillus* en sorgo (Gonzalez et al., 1997; Lahouar et al., 2015; Weledesemayat et al., 2016), son pocos los estudios que demuestran su presencia en trigo. Estudios realizados en Argentina mostraron que las especies de *A. flavus* se encuentran presentes en trigo en niveles inferiores al 10% (González et al., 2008), mientras que estudios realizados en el sur de Brasil mostraron porcentajes de infección más elevados para *A. flavus* (37.7%) y *A. parasiticus* (13,2%) (Savi et al., 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores a los obtenidos en ambos países. Por otra parte, trabajos realizados en Argelia donde las condiciones climáticas son más favorables para el desarrollo de *Aspergillus* describen que ésta es la especie prevalente en trigo, llegando a alcanzar valores superiores al 70 % de infección (Riba et al., 2010).

En relación a la presencia de especies de *Aspergillus* sección *Flavi* en sorgo, estudios realizados en Argentina muestran niveles más elevados a los obtenidos en este trabajo, encontrándose niveles del 40 y 60% para *Aspergillus*, siendo *A. flavus* la especie predominante (Gonzales et al., 1997). También en Brasil, estudios realizados en sorgo mostraron la presencia de *Aspergillus* en niveles elevados (42,7%), y a *A. flavus* como la especie predominante (Da Silva et al., 2000; Keller et al., 2012). Por el contrario, Alves dos Reis et al. (2010) encontró en sorgo de Brasil una baja frecuencia de aislamientos de *A. flavus* (3%) y *A. parasiticus* (4%). Este resultado es similar a los obtenidos por

Ratnavathi & Sashidhar (2003) en India y Lahouar et al. (2015) en Egipto y Túnez. Estos autores plantearon que la baja incidencia de especies de *Aspergillus* en sorgo podría deberse a las características físicas y bioquímicas del grano como es la presencia de taninos condensados, los cuales harían que este grano sea menos susceptible a la contaminación por *Aspergillus* en relación a otros granos. Esto podría explicar porque en este trabajo se encontró una menor contaminación en sorgo que en trigo. Por otra parte, *A. flavus* se caracteriza por producir una amplia variedad de enzimas extracelulares, lo cual probablemente aumente su capacidad para utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos (van der Hondel et al., 1992). Así, la falta de especialización de esta especie por un huésped favorecería la permanencia de *A. flavus* en el ecosistema de un año a otro colonizando los distintos cultivos (Angle et al., 1982; Dutton, 1988). Estas características podrían explicar de cierta manera la presencia de estas especies en cultivos tan diversos.

Dado que el trigo es un cultivo de invierno y el sorgo uno de verano sería esperable encontrar niveles de contaminación mayores en sorgo que en trigo ya que las condiciones climáticas de altas temperaturas y humedad favorecen el desarrollo de hongos de la sección *Flavi*. Sin embargo, la temperatura promedio durante el desarrollo del grano de trigo (noviembre / diciembre) y del grano de sorgo (marzo / abril) fue similar y cercana a los 20°C. Así mismo, el trigo analizado en este trabajo corresponde a la cosecha del año 2009, año en el que en nuestro país se evidenciaron altos niveles de humedad por frecuentes lluvias durante el desarrollo del grano (133 mm). En cambio, para el grano de sorgo las precipitaciones acumuladas fueron de 67 mm (INIA, 2016). Estos motivos asociados a la baja susceptibilidad del sorgo por lo antes mencionado, podrían ser una posible explicación de una mayor contaminación del trigo que del sorgo.

En base a las características morfológicas, todas las cepas aisladas fueron identificadas como *A. flavus*. Si bien *A. parasiticus* y *A. flavus* presentan diferencias en la rugosidad de los conidios (*A. parasiticus* muy rugosos; *A. flavus* lisos a finamente rugosos) y en la coloración de las colonias que podrían permitir su identificación (Klich, 2002a), en el presente trabajo estas características no permitieron esta diferenciación. Esto confirma la necesidad de realizar una metodología de

identificación polifásica, que incluye las características morfológicas, moleculares y de producción de metabolitos secundarios tóxicos (Rodrigues et al., 2011).

Los esclerocios son estructuras de resistencia que le permiten al hongo sobrevivir bajo condiciones adversas y retomar su crecimiento cuando éstas se tornan favorables para su desarrollo. Esto constituye un importante mecanismo que le permite al hongo preservar su inóculo primario en el campo (Wicklow, 1987). En base a esto, los aislamientos fueron caracterizados en cuanto a la presencia, tamaño, forma y cantidad de esclerocios producidos. De las 80 cepas seleccionadas pertenecientes a la sección *Flavi*, 67 (84%) fueron capaces de producir esclerocios cuando se las incubó en medio CZ a 30 °C. Esto indica que las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de nuestro país tienen una alta capacidad para producir esclerocios, lo cual es un factor muy importante a la hora de determinar el potencial de la población de persistir en el campo y consecuentemente producir deterioro y contaminación de los granos con aflatoxinas en diversos cultivares. La amplia mayoría de las cepas aisladas produjeron esclerocios de tipo L (> 400 µm). Este resultado concuerda con lo encontrado por otros autores quienes encontraron un predominio de cepas tipo L por sobre las del tipo S (Pildain et al., 2004; Abbas et al., 2005; Giorni et al., 2007; Atehnkeng et al., 2008; Donner et al., 2009; Astoreca et al., 2011). Ciertos autores señalan que las cepas tipo S son poco frecuentes (Vaamonde et al., 2003; Barros et al., 2006; Giorni et al., 2007) y que la producción de este tipo de esclerocio podría ser una característica de supervivencia para adaptarse a rápidas fluctuaciones climáticas y condiciones extremas de humedad y temperatura, como las que ocurren en zonas desérticas (Bigelow et al., 2000; Cardwell & Cotty 2002). En este trabajo solo 2 cepas productoras de esclerocios de tipo S fueron aisladas de sorgo. Esta baja incidencia podría deberse a que las condiciones climáticas de nuestro país no son las adecuadas para el desarrollo de este tipo de esclerocios.

En general la mayoría de las cepas que produjeron esclerocios lo hicieron en un número elevado. Algunos autores han señalado que las cepas del tipo S producen esclerocios en mayor cantidad y

menor tamaño en relación a las cepas L, y que en general producen mayores niveles de aflatoxinas (Garber & Cotty, 1997; Chang et al., 2001; Novas & Cabral, 2002; Barros et al., 2005). Sin embargo, otros autores no han podido demostrar una relación entre el tamaño de esclerocio y la producción de aflatoxinas (Razzaghi-Abyaneh et al., 2006; Gironi et al., 2007; Astoreca et al., 2011). En este trabajo si bien una de las cepas S produjo un gran número de esclerocios y los mayores niveles de AFB1 (>15.000 µg/kg), la otra cepa no fue capaz de producir aflatoxinas ni tampoco un gran número de esclerocios. Por otro lado, la mayoría de las cepas L aisladas no produjeron aflatoxinas, por lo que la relación anteriormente planteada si bien no puede ser confirmada tampoco puede ser rechazada ya que para esto sería necesario analizar un mayor número de cepas del tipo S.

Dado que los esclerocios de *A. flavus* y *A. parasiticus* se desarrollan entre 28 y 35°C (Domsch et al., 1980) y que en nuestro país las temperaturas del suelo pueden alcanzar dichas temperaturas en los meses de verano, el tener un alto porcentaje de cepas capaces de producir este tipo de estructura puede ser considerado un riesgo potencial ya que los esclerocios pueden germinar y ser una fuente importante de inóculo, proporcionándoles además a estas cepas una ventaja ecológica significativa. El análisis filogenético realizado a las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de trigo y sorgo permitió determinar la presencia de cepas pertenecientes a *A. flavus*, y *A. parasiticus*. En este trabajo los genes analizados no permitieron diferenciar a *A. flavus* de *A. oryzae*. Soares et al. (2012) analizaron cepas de la sección *Flavi* aisladas de maíz y en base a la secuencia del gen de la β tubulina y de la calmodulina sugirieron a *A. oryzae* como una especie ex-tipo, no presentando diferencias en su secuencia para estos genes con *A. flavus*. Por otro lado hay autores que postulan que estas dos especies son genéticamente idénticas presentando solo algunas diferencias a nivel de los genes involucrados en las rutas biosintéticas para las aflatoxinas, hecho que permitiría definir las como especies distintas (Watson et al., 1999; Geiser et al., 2000; Chang et al., 2006; Tominaga et al., 2006; Godet & Manau, 2010; Varga et al., 2011). Dentro de la especie *A. flavus* se encontraron tres grupos de especies asociados a distintas cepas de referencia, un grupo se asoció a la especie *A. flavus* NRRL 458 y *A. oryzae* CBS 100925, otro grupo se asoció a la cepa de *A. flavus* CBS 282.95, y finalmente

se encontraron especies asociadas a *A. effusus* NRRL 506. Tanto *A. oryzae* y *A. effusus* son consideradas como especies ex tipo de *A. flavus* (Varga et al., 2009; Soares et al., 2012), por lo que fueron consideradas como cepas de *A. flavus*.

Por otra parte, esta es la primera vez que se describe la presencia de cepas de *A. parasiticus* en Uruguay, lo cual es de gran interés ya que esta especie es capaz de producir aflatoxinas del tipo B y G y en general todos los aislamientos son toxicogénicos (Varga et al., 2011), aunque el aislamiento aquí encontrado no presentó la capacidad de producir ninguna toxina.

Diversos estudios que analizaron la distribución de las especies pertenecientes a la sección *Flavi* de suelos de diversas regiones del mundo, demostraron que la especie que se encuentra con mayor frecuencia es *A. flavus*. Vaamonde et al. (2003) estudiaron la presencia de especies pertenecientes a la sección *Flavi* en diferentes sustratos (nueces, soja y trigo), siendo en todos ellos *A. flavus* la especie predominante seguida de *A. parasiticus*. A su vez, Astoreca et al. (2011) estudiaron las poblaciones de *Aspergillus* sección *Flavi* en ración de aves, donde encontraron una alta prevalencia de *A. flavus* (99%) dentro de la sección, con un bajo porcentaje de aislamientos de *A. parasiticus* (1%). En los trabajos realizados en Brasil por Baquiao et al. (2013) y Reis et al. (2014) en nueces *A. flavus* fue la especie predominante con porcentajes de aislamiento similares (75%) seguida de *A. nomius*. En Argelia, Riba et al. (2014) en trigo encontró que *A. flavus* fue la especie mayormente aislada dentro de la sección *Flavi* (96%). Todos estos trabajos concuerdan con los resultados aquí obtenidos, donde si bien existió un gran número de cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie existió una alta prevalencia de la especie *A. flavus* tanto en trigo (45%) como en sorgo (54%). Por otro lado, Sales et al. (2005) en arroz en Filipinas encontraron frecuencias similares de aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus*, estas diferencias podrían estar relacionadas al tipo de sustrato y a las condiciones climáticas de dicha región.

La cepa 42, que presenta características que la distinguen del resto de las cepas analizadas, fue agrupada a *A. effusus* (*A. flavus*) cuando se hizo el análisis de los tres genes concatenados. Esta cepa fue una de las 2 cepas S aisladas de sorgo con capacidad de producir un gran número de esclerocios

y con mayor capacidad toxicogénica ( $[AFB1] > 15000 \mu\text{g/kg}$ ). Fue también capaz de producir todos los tipos de aflatoxinas y ACP. Estas características son similares a las descritas para *Aspergillus minisclerotigenes* (Piladin et al., 2008), especie descrita en Argentina en el año 2008 aislada de nueces de Argentina, Nigeria y Estados Unidos. Por otro lado, *Aspergillus parvisclerotigenus* (Frisvad & Samson, 2005) es una especie que presenta características morfológicas similares a *A. minisclerotigenes* pero posee la capacidad de producir parasiticolide (Piladin et al., 2008). Esta especie produce esclerocios del tipo S y aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 además de otros metabolitos. Dado que esta especie fue descrita en Argentina, sería de interés realizar otros estudios para confirmar la identificación de la cepa 42, ya que la presencia de *A. minisclerotigenes* no ha sido aún descrita en nuestro país y es de suma importancia debido a su alto potencial toxicogénico y la gran variedad de toxinas que es capaz de producir. Además, la presencia de este tipo de cepas es un indicador de alto riesgo para los cultivos.

Por otra parte, el 45% de los aislamientos pudieron ser identificados únicamente como pertenecientes al clado *A. flavus* no logrando ser identificados a nivel de especie. A partir del análisis de las secuencias de las regiones ITS, calmodulina y  $\beta$ -tubulina de las cepas que conformaron este grupo se pudo determinar que, en el estudio del gen de la calmodulina, estas cepas presentan secuencias idénticas a las cepas de referencia *A. flavus* CBS 282.95 excepto por una base situada en la posición 590. Se pudo determinar además que este cambio de base no implica una sustitución aminoacídica por lo que no existirían modificaciones en la proteína para la cual codifica. Sería de interés realizar un estudio de estas cepas empleando un número más variado de genes o genes más específicos de manera de poder lograr identificar a estas cepas a nivel de especie.

En este trabajo se observó un 60% de cepas no toxicogénicas, habiéndose obtenido resultados similares en sorgo de Brasil, donde el 46% de las cepas de *A. flavus* eran no toxicogénicas (da Silva et al.; 2004). En cambio, la relación de cepas no aflatoxicogénicas : toxicogénicas encontrada en trabajos realizados en Argentina difieren ampliamente de los aquí obtenidos. Astoreca et al. (2011) en el estudio realizado a cepas de *Aspergillus* aisladas de raciones para pollos determinó que solo un

9% de las cepas eran no toxicogénicas, mientras que Vaamonde et al. (2003) encontró en maní, soja y trigo un predominio de cepas toxicogénicas en valores superiores al 70%. Esto podría estar asociado con el tipo de sustrato del cual fueron aisladas las cepas ya que la producción de aflatoxinas depende de la composición del mismo. La producción de aflatoxinas está directamente relacionada con el número de dobles enlaces de ácidos grasos libres y esterificados presentes en el sustrato (Fanelli & Fabbri, 1989). Es, en este sentido que Ratnavathi & Sashidhar (2003) y Alves dos Reis et al. (2010) plantean que las características físicas y la composición bioquímica de los granos de sorgo, principalmente la presencia de taninos condensados, lo hacen menos susceptible a la infección por hongos pertenecientes a *Aspergillus* en comparación a otros cereales. El bajo número de cepas aflatoxicogénicas también podría estar vinculado al tipo de esclerocio ya que la producción variable y reducida de aflatoxinas son características de las cepas L de *A. flavus* (Cotty, 1989). La presencia de cepas no toxicogénicas podría ser el resultado de un proceso evolutivo en el cual un grupo de cepas está adaptado a un nicho ecológico donde el hecho de producir aflatoxinas no le confiere una ventaja selectiva. *Aspergillus parasiticus* y las cepas del tipo S de *A. flavus*, que producen altos niveles de aflatoxinas, están asociadas al suelo, mientras que las cepas del tipo L a las parte aéreas de las plantas, por lo tanto el suelo podría favorecer la conservación de cepas productoras de toxinas, mientras que las partes aéreas no lo harían (Davis & Deiner, 1983).

Si bien el 40 % del total de las cepas aisladas en este trabajo fueron capaces de producir algún tipo de toxina, el 27,5% del total de las cepas fueron capaces de producir aflatoxinas y el 25% ACP como únicas toxinas o combinadas. Entre las cepas aisladas, todas las combinaciones toxicogénicas fueron encontradas, así como también cepas capaces de producir aflatoxinas únicamente del tipo B (6%) y otras capaces de producir únicamente toxinas del tipo G (2%). De las dos cepas S aisladas una de ellas fue no productora de toxinas mientras que la otra (cepa 42) produjo los cuatro tipos de aflatoxinas y ACP, no pudiéndose realizar asociaciones en este sentido debido al bajo número de aislamientos de cepas S. Cardwell & Cotty (2002) en su trabajo realizado en el oeste de África describieron cepas S de *A. flavus* capaces de producir aflatoxinas del tipo G y B y cepas L capaces de

producir únicamente las del tipo B. Por su parte, en Argentina, se encontraron cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas del tipo B (AFB1 y AFB2), productoras de ACP, de ambas y no toxicogénicas (Vaamonde et al., 2003; Astoreca et al., 2011), mientras que en Brasil da Silva et al. (2004), encontró que las cepas de *A. flavus* eran mayormente productoras de las aflatoxinas del tipo B (AFB1 y AFB2). Lahouar et al. (2015) encontró un predominio de cepas de *A. flavus* no toxicogénicas (64%) en sorgo, mientras que las toxicogénicas produjeron solo toxinas del tipo B. Todos estos trabajos demuestran la gran variabilidad de perfiles toxicogénicos que se pueden encontrar en las especies de esta sección. Si bien en este trabajo también se encontró una gran variabilidad de perfiles toxicogénicos, dentro de las cepas, el quimiotipo prevalente fue el IV (ACP; 25%), seguido de los quimiotipos III (AFB; 12,5%) y VII (AFB y AFG; 12,5%). Por lo tanto, es esperable encontrar en los sustratos una única toxina como la co-ocurrencia de estas toxinas.

En base a estos resultados es que se considera que la producción de toxinas por parte de los hongos pertenecientes a la sección *Flavi* es muy diversa y se han definido diferentes quimiotipos en base a su perfil toxicogénico (Rodrigues et al., 2009). En relación a la producción de micotoxinas, Giorni et al. (2007) propuso clasificar a los hongos pertenecientes a *A.* sección *Flavi* en siete grupos (quimiotipos), quimiotipo I: AFB1 > AFB2 y ACP; quimiotipo II: AFB1 < AFB2 y ACP; quimiotipo III: AFB; quimiotipo IV: ACP; quimiotipo V: no productoras; quimiotipo VI: AFB, AFG y ACP; quimiotipo VII: AFB y AFG. Se observó la presencia de cepas pertenecientes a todos los quimiotipos descritos por Giorni et al., 2007 excepto para el quimiotipo II en el que se produce mayor cantidad de AFB2 que de AFB1 conjuntamente con ACP, ya que cuando se encontraron conjuntamente AFB1 y AFB2 siempre fue mayor la concentración del tipo AFB1. Además, fue necesario incorporar a esta clasificación los quimiotipos VIII y IX ya que se encontraron cepas con dos diferentes quimiotipos; el quimiotipo VIII: AFB1 y ACP y el quimiotipo IV: AFG. En este caso los aislamientos identificados como *A. flavus* también presentaron perfiles toxicogénicos variados, existiendo un predominio de cepas productoras de ACP.

Resultados similares fueron encontrados en estudios de poblaciones de *A. flavus* aisladas de maíz

(Resnik et al., 1996; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006), nueces, trigo y soja (Vaamonde et al., 2003) donde una alta incidencia de cepas *A. flavus* fueron productoras de ACP. Debido al alto porcentaje que existe en nuestro país de cepas capaces de producir esta toxina, sería de interés evaluar cuáles son las condiciones que favorecen su producción, los posibles efectos de la co-ocurrencia con aflatoxinas como así también evaluar si es necesario considerar a esta micotoxina en los productos alimentarios como medida sanitaria para su consumo. Si bien la presencia de cepas toxicogénicas no asegura la síntesis de toxinas en el sustrato, que cepas de este tipo sean los contaminantes naturales de los granos debe ser considerado como un factor de riesgo y plantea la necesidad de realizar un monitoreo continuo acerca de la presencia de aflatoxinas y ACP de manera de establecer el riesgo de contaminación existente. Sumado a esto en nuestro país existen solo niveles máximos permitidos para aflatoxinas en algunos alimentos, pero no así para trigo y sorgo.

Hasta la fecha no existían en nuestro país estudios realizados en sorgo y trigo sobre la presencia de especies de *Aspergillus* sección *Flavi* y su caracterización toxicogénica. Por este motivo, este trabajo es de gran importancia ya que permite conocer por primera vez la biodiversidad de especies de esta sección y su potencial toxicogénico en granos de nuestro país. La información generada permitirá así aportar al conocimiento de estas especies en cultivos antes no estudiados y poder definir estrategias adecuadas para la prevención y control de la contaminación de los granos por micotoxinas.

## **8. Conclusiones**

- Los granos de trigo y sorgo de nuestro país presentan colonización por hongos pertenecientes a la sección *Flavi* de *Aspergillus*.
- *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* fueron las especies de la sección *Flavi* aisladas de trigo y sorgo, siendo *A. flavus* la de mayor prevalencia.
- En relación al tipo de esclerocio producido, las cepas del tipo L fueron las más frecuentes.
- De las cepas aisladas el 40% fueron toxicogénicas.
- Se observó una gran variedad de perfiles toxicogénicos con una alta incidencia de aislamientos productores de ACP.

## **9. Bibliografía**

- Abbas, H., Weaver, M., Zablutowicz, R., Horn, B., Shier, W., 2005. Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta. *European J. of Plant Pathology* 112: 283–287.
- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Pozzi, C., da Silva, V., Ortega, E., Correa, B., 2010. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *J. Sci. Food Agric.* 90: 1445-1451.
- Alves dos Reis, T., Baquião, A., Atayde, D., Grabarz, F., Corrêa B., 2014. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. *Food Microbiol.* 42: 34-39.
- Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M., 1996. *Introductory Mycology*; 4th Ed: John Wiley and Sons, New York, USA.
- Amusa, N., Falola, O., 2004. Pre-harvest fungal infection of *sorghum* (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivars in the humid forest agroecological zones of Nigeria. *Acta fitotechnica et zootechnica* 7: 7-10.
- Angle, J., Dunn, K., Wagner, G., 1982. Effect of cultural practices on the soil populations of *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 46: 301-304.
- Astoreca, A., Dalcerro, A., Fernández, V., Vaamonde, G., 2011. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. *Int. J. of Food Microbiol.* 146: 38–43.
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P., Donner, M., Ikotun, T., Sikoram, R., Cotty, P., Bandyopadhyay, R., 2008. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 74–84.
- Balachandran, C., Parthasarathy, K., 1996. Occurrence of cyclopiazonic acid in feed and feed stuffs in Tamil Nadu, India. *Mycopathologia* 133: 159-162.
- Baquião, A., Martins, M., Alves do Reis, T., Zorzete, P., Diniz, D., Correa, B., 2013. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry* 139: 1127–1132.
- Barros, G., Torres, M., Chulze, S., 2005. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *J. Sci. Food Agric.* 85: 2349-2353.
- Barros, G., Torres, A., Rodriguez, M., Chulze, S., 2006. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biol. and Biochem.* 38: 145–152.
- Bennett, J., Christensen, S., 1983. New perspectives on aflatoxin biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* 29: 53-92.
- Bennett, J., Papa, K., 1988. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Adv. Plant Pathol.* 6: 263–280.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K., Cleveland, T., 1992. Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites. En: *Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Capítulo 10, Ed. Town Publishers.

- Bigelow, D., Orum, T., Cotty, P., Nelson, M., 2000. Monitoring *Aspergillus flavus* AF36 and S strain incidence in the desert Southwest. APS Pacific Division Meeting Abstracts (Joint with Canadian Phytopathological Society), Victoria, BC, Canada.
- Bragulat, M., Abarca, M., Cabes, F., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 139-144.
- Buchi, G., Rae, D., 1969. The Structure Chemistry of the aflatoxins *Food Science and Technology*. Leo A. Goldblatt, Ed. Aflatoxin Academic Press New York, pp 55-73.
- Bueno, D., Silva, J., Oliver, G., 2004. Mycoflora in comercial pet foods. *J Food Protection*, 64: 741-743.
- Bullerman, L., Draughon, F., 1994. *Fusarium moliniforme* and fumonisins symposium introduction. *J. Food Protection*, 57: 513.
- Cacciò, S., Cammà, C., Onuma, M., Severini, C., 2000. The [beta]-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* 30: 1181-1185.
- Cardwell K., Cotty P., 2002. Distribution of *Aspergillus* Section *Flavi* among Field Soils from the Four Agroecological Zones of the Republic of Bénin, West Africa. *The American Phytopathological Society* 86: 434-439.
- Cathey, C., Nuang, Z., Sarr, A., Clement, B., Phililips, T. 1994. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk. *J. of Dairy Sci.* 77: 1223-1231.
- Chang, P., Bennett, J., Cotty, P., 2001. Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 153: 41-48.
- Chang, P., Ehrlich, K., Hua S., 2006. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *Int. J. of Food Microbiol.* 108: 172-177.
- Codner, R., Sargeant, K., Yeo, R., 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnol. Bioeng.* 5: 185-192.
- Cotty, P. J., 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808-814.
- da Silva, J., Pozzi, C., Mallozzi, M., Ortega, E., Correa, B., 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4352 - 4356.
- da Silva, J., Dilkin, P., Fonseca, H., Corrêa, B., 2004. Production of aflatoxinas by *Aspergillus Flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Brazilian J. of Microbiol.* 35: 182-186.
- Davis, N., Deiner, U., 1983. Biology of *A. flavus* and *A. parasiticus*, some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. En: *Aflatoxin and Aspergillus in Corn*. Ed: Diener, U., Asquith, R., Dickens, J., Auburn University, Auburn. pp. 1-5.
- Díaz, D., 2008. *El libro azul de Micotoxinas*. Nottingham University Press, United Kingdom.

- DIEA, 2015. Estadísticas Agropecuarias Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, República Oriental del Uruguay.
- Domsch KH, Gams W, Anderson T, 1980. Compendium of soil fungi. London: Academic Press pp. 90–94.
- Dorner, J., Cole, R., Diener, U., 1984. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia* 87:13-15.
- Dorner, J., Cole, R., Lomax, L., 1985. The toxicity of ciclopiazonic acid. En: Trichotecenes and others mycotoxins. Lacey, J., Ed: John Wiley y Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Dorner, J., Cole, R., Erlington, D., Suksupath, S., McDowell, G., Bryden, W., 1994. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. *J. of Agric. and Food Chem.* 42: 1516–1518.
- Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R., Bandyopadhyay, R., Cotty, P., 2009. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil. Biol. Biochem.* 4: 37–44.
- Dutton, M., 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews* 52: 274-295.
- Edgar, R., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Ehrlich, K., Chang, P., Yu, J., Cotty, P., 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cyp A* is required for G aflatoxin formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6518–6524.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Fanelli, C., Fabbri, A., 1989. Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia* 107: 115–120.- FAO., 2003. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed N° 81.
- Frisvad, J., Samson, R., Smedsgaard, J., 2004. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 440–445.
- Frisvad, J., Skouboe, P., Samson, R., 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-Omethylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 442–453.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A., Pitt, J., Samson, R., 1986. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Ed. Samson, R. y Pitt, J., Plenu, Publ., New York, USA.
- Garber, R., Cotty, P., 1997. Formation of Sclerotia and Aflatoxins in Developing Cotton Bolls Infected by the S Strain of *Aspergillus flavus* and Potential for Biocontrol with an Atoxigenic Strain. *Phytopathology* 87: 940-945.
- Geiser, D., Dorner, J., Horn, B., Taylor, J., 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium

production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biol. 31: 169-179.

- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. Int. J. of Food Microbiol. 113: 330–338.

- Glass, N., Donaldson, G., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Appl. Environ. Microb. 61: 1323–1330.

- Godet, M., Munaut, F., 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. FEMS Microbiol. Lett. **304**: 157–168.

- González, H., Martínez E., Resnik, S., 1997. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. Mycopathologia 139: 35–41.

- González, H., Molto, G., Pacin, A., Resnik, S., Zelaya, M., Masana, M., Martínez, E., 2008. Trichothecenes and Mycoflora in Wheat Harvested in Nine Locations in Buenos Aires Province, Argentina. Mycopathologia 165:105–114

- Gonçalves, E., da Silva, J., Alves dos Reis, T., Kobushi Nakai, V., D'Arc Felicio, J., Corrêa, B., 2013. Production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* strains isolate from peanuts. Arq. Inst. Biol. 80: 312-317.

- Griffin, G., Garren, K., 1976. Colonization of rye green manure and peanut fruit debris by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* group in field soils. Appl. Environ. Microbiol. 32: 28–32.

- Hara, S., Kitamoto, K., Gomi, K., 1992. New developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. En: *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Bennett, J., Klich, M., (Eds). Boston, Butterworth – Heinemann.

- Hills, D., Bull, J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic Biology 42: 182–92.

- Horn, B., Dorner, J., 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.

- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 56: 171–176.

- Ito, Y., Peterson, S., Wicklow, D., Goto, T., 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycol. Research 105: 233–239.

- Jayas, D., White, N., Muir, W., 1995. Stored-grain ecosystems. Ed: Jayas, D., White y N., Muir, W. Marcel Dekker, INC.

- Jayashree, T., Praveen Rao, J., Subramanyam, C., 2000. Regulation of aflatoxin production by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein phosphorylation and dephosphorylation. FEMS Microbiol. Lett. 183: 215–219.

- Juvvadi, P., Chivukula, S., 2006. Putative Calmodulin-Binding Domains in Aflatoxin Biosynthesis–Regulatory Proteins. Current Microbiology 52: 493–496.

- Keller, L., Pereyra, C., Cavaglieri, L., Keller, K., Almeida, T., Deveza, M., Assad, R., Rosa, C., 2012. Fungi and aflatoxin B1 in pre and post-fermented sorghum trench type silos destined to bovine

intensive-rearing in Brazil. *Bio. Ciencias* 2: 81–91.

- Khan, K., Shewry, P., 2009. *Wheat: Chemistry and Technology* 4<sup>th</sup> ed. AACC International Inc.
- Klich, M., Pitt, J., 1985. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 99–108.
- Klich, M., 2002 a. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94: 21-27.
- Klich, M., 2002 b. Identification of Common *Aspergillus* Species. Ed: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich M., Pitt J., 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 99–108.
- Kurtzman, C., Horn, B., Hesseltine, C., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147–158.
- Lahouar, A., Crespo-Sempere, A., Marín, S., Saïd, S., Sanchis, V., 2015; Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *Journal of Stored Products Research* 63: 57-62.
- Le Bars, J., 1990. Contribution to a practical strategy for preventing aflatoxin contamination of dried figs. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 8: 265-270.
- Magnoli, C., Chiacchiera, S., Miazzo, R., Palacio, G., Angeletti, A., Hallak, C., Dalcerro, A., 2002. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. *Mycotoxin Research* 18: 8–22.
- Mari S., 2003. Sorgo: Planificando la siembra uruguaya. *Plan agropecuario*, setiembre 56-58.
- Martins, M., Martins, H., Gimeno, A., 2003. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Additives and Contaminants* 20: 1127-1131.
- MERCOSUR/Gmc/Res. N° 25/02, 2006. Reglamento técnico Mercosur sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz.
- Moncoq, K., Trieber, C., Young, H., 2007. The Molecular Basis for Cyclopiazonic Acid Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 9748 – 9757.
- Murakami, H., 1971. Classification of the koji mould. *J. Gen. App. Microbiol.* 17: 281–308.
- Murakami, H., Hayashi, K., Ushijima, S., 1982. Useful key characters separating three *Aspergillus* taxa: *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. flavus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28: 55–60.
- Norred, W., Porter, J., Dorner, J., Cole, R., 1988. Occurrence of the mycotoxin cyclopiazonic acid in meat after oral administration of chickens. *J. Agric. Food Chem.* 36: 113-116.
- Novas, M., Cabral, D., 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Disease* 86:215–219.
- Pereyra, S., Germán, S., 2012. Manejo de enfermedades en trigo y cebada en un contexto de márgenes reducidos. *Jornada Cultivos de Invierno, La Estanzuela, INIA Serie Actividades de*

- Peterson, S., Ito, Y., Horn, B., Goto, T., 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689–703.
- Pier, A., 1991. The influence of mycotoxin on the immune system. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. Ed: Smith, J. E. y Henderson, R.S. 489-497pp. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Pildain, M., Vaamonde, G., Cabral, D., 2004. Analysis of population structure of *A. flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *Int. J. of Food Microbiol.* 93: 31–40.
- Pildain, M., Frisvad, J., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R., 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 725–735.
- Pitt, J., Hocking, A., 1997. *Fungi and food spoilage*. CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic Press., Australia.
- Popescu, A., Condei, R., 2014 Some considerations on the prospects of Sorghum crop. *Management, economic engineering in agriculture and rural development* 14: 295-304
- Rao, B., Housain, A., 1985. Presence of Cyclopiazonic Acid in Kodo Millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing “Kouda poisoning” in man and its production by associated Fungi. *Mycopathologia* 22: 993-998.
- Raper, K., Fennell, D., 1965. *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Co., Baltimore, MA, USA. pp. 686.
- Ratnavathi, C., Sashidhar, R., 2003. Substrate suitability of different genotypes of sorghum in relation to *Aspergillus* infection and aflatoxin production. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3482-3492.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Shiri, A., Bahadori, S., Mirzahoseini, H., 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* Section *Flavi* in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161: 183–192.
- Resnik, S., Gonzalez, H., Pacin, A., Viora, M., Caballero, G., Gros, E., 1996. Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *A. flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research* 12: 61–66.
- Rinaldi, M., 1983. Invasive aspergillosis. *Rcv. Infect. Dis.* 5. 1061:1077.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathhieb, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2010. *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food Chem.Toxicol.* 48: 2772-2777.
- Riba, A., Bosia, C., Baroudi, M., Ollino, L., Caselle, M., 2014. A combination of transcriptional and microrna regulation improves the stability of the relative concentrations of target genes. *PLoS Comput. Biol.*10: e1003490.
- Robens, J., Richard, J., 1992. Aflatoxins in animal and human health. *Rev. Environ. Contain. and Tox.* 127: 69-94.

- Roberts, D., Yendol, W., 1971. Use of fungi for microbial control of insects. En: Microbial Control of Insects and Mites. Ed: Burges, R. y Burges. N. Academic Pres, New York.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, S., Lima, N., 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. Int. J. of Food Microbiol. 129: 187–193.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N., 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. J. of App. Microbiol. 111: 877–892.
- Ross, P., Rice, L., Casper, H., Crenshaw, J., Richards, L., 1991. Novel occurrence of cyclopiazonic acid in sunflower seeds. Vet. Hum. Toxicol. 33: 284–285.
- 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, R., van Reenen-Hoekstra, E., Frisvad, J., Flitenborg, O., 2000. Introduction to Food and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, The Netherlands.
- Sanchis, V., Viñas, I., Jimenez, M., Hernandez, E., 1984. Diferencias morfológicas y enzimáticas entre cepas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas. An. Biol. Spec. 1: 109-114.
- Savi, G., Piacentini, K., Tibola, C., Scussel, V., 2014. Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum*) from Southern Brazil. [Food Addit. Contam. Part A](#) 7: 232-7.
- Schroeder, H., 1966. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Microbiol. 14: 381–385.
- Serra, R., Peterson S., 2007. *Penicillium astrolabium* and *Penicillium neocrassum*, two new species isolated from grapes and their phylogenetic placement in the *P. olsonii* and *P. brevicompactum* clade. Mycologia 99: 78– 87.
- Sidhu, G., 2002. Mycotoxins genetics and gene clusters. Eur. J. Plant. Path. 108: 705-11.
- Slemmons, C., Johnson, G., Connell, L., 2013. Application of an automated ribosomal intergenic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. Antarct. Sci. 25: 44-50.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S., Lima, N., Venâncio, A., 2012. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. Mycologia 104 : 682-697.
- Steyn, P., 1980. The biosynthesis of mycotoxins. A study in secondary metabolism. Academic Press, New York, London.
- Sweeney, M., Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. Int. J. Food Microbiol. 43: 141-158.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30: 2725–2729.

- Tominaga, M., Lee, Y., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, K., Gotoh, K., Akita, O., 2006. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 484-490.
- Torres M., Medina, J., Lázaro, J., 2014. Aflatoxicosis: A problem to solve in veterinary medicine. *Revista electrónica de Veterinaria* 15: 1695-7504 (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>). (consultada; 4 de setiembre de 2016)
- Unusan, N., 2006. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1897-1900
- Urano, T., Trucksess, M., Matusik, J., Dorner, J., 1992. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 75: 319-322.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez 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.
- van den Hondel, C., Punt, P., van Gorcom, R., 1992. Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 61: 153-60.
- Varga, J., Frisvad, J., Samsom, R., 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin J.* 2: 263-277.
- Varga, J., Frisvad, J., Samson, R., 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* 69: 57-80.
- Wadhwani, K., Sirvastava, M., 1985. *Aspergillus flavus* Link as an antagonist against aphids of crucifers. *Acta Botanica Indica* 13: 281-282
- Ward, P., Lo, J., Duke, M., May, G., Headon, D., Connely, O., 1992. Production of biological active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio. Technol.* 10: 784-789.
- Watson, A., Fuller, L., Jeenes, D., Archer, D., 1999. Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of aflR in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 307-310.
- Weledesemayat, G., Gezmu, T., Woldegiorgis, A., Gemedede, H., 2016. Study on *Aspergillus* Species and Aflatoxin Levels in *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L.) Stored for Different Period and Storage System in Kewet Districts, Northern Shewa, Ethiopia. *Food. Sci. Nutr.* 2: 010.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Ed. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wicklow, D., Donahue, J., 1984. Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* y *A. Parasiticus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 621-624.
- Wicklow, D., 1987. Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia in soil. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 89: 131-134
- Wicklow, D., 1988. Metabolites in the coevolution of fungal chemical defense systems. En: *Coevolution of fungi with plants and animals*. Ed. K. A., Pirozynski y D. L., Hawksworth. Academic Press, Inc., New York.

- Wicklow, D., 1990. Adaptation in *Aspergillus flavus*. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 511-523.
- Yasui, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Ohya, Y., Tamura, G., 1995. Cloning and Nucleotide Sequence of the Calmodulin-Encoding Gene (*cmdA*) from *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1444-1449.
- Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Payne, G., Linz, J., Woloshuk, C., Bennett, J., 2004. Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. App. Environ. Microbiol. 70: 1253–1262.
- Zhao, Z., Liu, H., Luo, Y., Zhou, S., An, L., Wang, C., Jin, Q., Zhou, M., Xu, J., 2014. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. Scientific Reports Vol 4.

## **Anexo**

- I. Diámetros (mm) de los aislamientos obtenidos de trigo a los siete días de incubación en los medios de cultivos indicados en la tabla para la identificación según la clave de Klich 2002.

CEPAS	CYA 25°C	CYA 37°C	MEA	CZ	CY20S
1	54	51	59	27	63
2	59	69	57	36	68
3	58	62	53	31	65
4	60	53	56	30	59
5	51	55	53	33	64
6	56	55	55	32	65
7	62	57	57	38	68
8	50	59	57	33	55
9	63	65	56	41	66
10	55	64	52	33	65
11	58	61	51	35	65
12	46	60	54	32	55
13	58	50	54	33	68
14	59	55	52	33	67
15	58	65	60	36	65
16	60	66	55	29	64
17	56	64	53	31	62
18	55	58	55	27	69
19	63	63	60	35	70
20	59	67	58	28	69
21	48	57	52	34	50
22	51	58	62	33	58
23	56	52	58	33	66
24	42	60	50	32	67
25	54	66	59	36	68
26	54	56	58	34	66
27	56	52	58	38	66
28	58	57	54	26	65
29	59	59	53	27	68
30	54	64	52	27	65
31	54	62	54	35	62
32	53	51	56	35	61
33	60	61	57	41	67
34	55	63	61	35	63
35	50	64	53	31	70
36	43	62	55	30	66
37	54	54	55	30	67
38	54	54	63	35	62
39	52	51	53	27	63
40	66	49	59	37	67

II. Diámetros (mm) de los aislamientos obtenidos de sorgo a los siete días de incubación en los medios de cultivos indicados en la tabla para la identificación según la clave de Klich 2002.

CEPA	CYA 25°C	CYA 37°C	MEA	CZ	CY20S
41	48	68	53	35	64
42	62	60	56	36	58
43	63	60	51	32	73
44	57	52	55	33	65
45	55	62	52	42	54
46	48	61	45	44	59
47	50	55	54	35	67
48	60	67	60	28	65
49	58	54	54	35	65
50	60	63	59	30	66
51	65	68	60	40	67
52	53	67	52	30	63
53	62	50	60	39	67
54	60	53	52	37	70
55	61	57	55	34	63
56	53	59	54	40	59
57	60	61	56	36	60
58	66	56	61	40	67
59	58	55	55	32	65
60	57	55	56	27	61
61	56	50	55	33	62
62	56	55	53	30	62
63	58	61	54	34	66
64	55	56	51	34	60
65	64	65	58	33	63
66	58	62	53	33	66
67	56	60	54	34	66
68	46	61	45	44	59
69	46	64	50	36	55
70	50	53	53	32	55
71	59	55	50	31	56
72	64	67	54	30	66
73	57	52	63	31	68
74	59	55	50	31	56
75	48	66	40	42	59
76	55	65	53	37	63
77	59	57	57	30	56
78	56	67	55	33	65
79	55	64	57	36	68
80	48	67	49	35	65