CHIOTTA, MARIA LAURA
Ocratoxina y asperg

2012 71189

71189

MFN:
Clasif:

MFN:
Clasif:
T-751

A mi familia
A Matias

71189

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
BIBLIOTECA

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

"Ocratoxina y *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas y vinos. Aspectos ecofisiológicos y genéticos"

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

María Laura Chiotta

Marzo 2012

Trabajo presentado por la Microbióloga María Laura Chiotta para optar al Título de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. Sofía Noemí Chulze _____

Co-Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. Mariana Combina _____

Miembros del Jurado:

Dra. Alicia Margarita Godeas _____

Dra. María Inés Medina _____

Dr. Juan Carlos Basílico _____

Río Cuarto, 19 de marzo de 2012

INDICE

Resumen/Abstract 1

I. INTRODUCCIÓN

1. Vitivinicultura en la Argentina 3
1.1 Características geográficas de las diferentes regiones vitivinícolas 5
2. El género *Aspergillus* 7
2.1 *Aspergillus* sección *Nigri* 8
2.2 Especies biseriadas 11
2.2.1 *Aspergillus carbonarius* 11
2.2.2 *Aspergillus ibericus* 11
2.2.3 "agregado" *Aspergillus niger* 11
2.3 Especies uniseriadas 12
3. Ocratoxinas 13
3.1 Toxicidad 13
4. Fumonisinas 15
3.1 Toxicidad 16
5. *Aspergillus* sección *Nigri*: ecofisiología y producción de ocratoxina A 17
6. Factores que afectan la dinámica de las poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* y la incidencia de ocratoxina A en los viñedos 17
6.1 Rol de los factores ambientales y agro-ecológicos 18
6.2 Rol de las prácticas de manejo 21
6.2.1 Sistemas de conducción 21
6.3 Rol de las plagas y enfermedades 21
6.3.1 *Planococcus ficus* 22
7. Herramientas moleculares para la identificación de las especies fúngicas 24
7.1 Marcadores moleculares basados en PCR 25
7.1.1 RFLP 25
7.1.2 RAPD 25
7.1.3 AFLP 26
7.2 Secuenciamiento 27
7.2.1 Genes del ADN ribosomal 27
7.2.2 Genes de proteínas 28
7.3 RT-PCR 30
7.4 PCR cuantitativa 31

II. HIPOTESIS y OBJETIVOS

1. Hipótesis 32
2. Objetivos 32
2.1 Objetivos específicos 32

III. MATERIALES Y METODOS

1. Muestreo 33

1.1 Recolección de datos adicionales 33

2. Análisis de la micoflora y *Aspergillus* sección *Nigri* en las uvas 35

2.1 Recuento, aislamiento e identificación de la micoflora contaminante 35

2.2 Identificación de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* 36

2.2.1 Cálculo del índice de biodiversidad de Shannon-Wiener 37

3. Perfil ocratoxigénico de las cepas de *Aspergillus* de la sección *Nigri* aisladas 37

3.1 Especies fúngicas 37

3.2 Capacidad toxigénica 37

3.3 Detección y cuantificación 38

4. Incidencia natural de ocratoxina A en muestras de uva 38

4.1 Análisis de ocratoxina A en uvas 38

4.2 Ensayo de recuperación de ocratoxina A 39

5. Incidencia natural de ocratoxina A en muestras de vino 39

5.1 Extracción de ocratoxina A en muestras de vinos 39

6. Análisis estadístico de los datos 39

7. Caracterización de las especies del género *Aspergillus* sección *Nigri* mediante el uso de marcadores moleculares generados mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados ($AFLP_s$) 40

7.1 Cepas 40

7.2 Producción de biomasa fúngica 40

7.3 Extracción y purificación del ADN genómico 41

7.4 Generación de los marcadores de $AFLP_s$ 41

7.5 Análisis de los datos 44

8. Caracterización de las especies del género *Aspergillus* sección *Nigri* mediante el secuenciamiento de los genes de la calmodulina, la β-tubulina, el factor de elongación 1α y la subunidad de la ARN polimerasa II 45

8.1 Cepas 45

8.2 Producción de biomasa fúngica 45

8.3 Extracción y purificación del ADN genómico 45

8.4 Generación de las secuencias 46

8.5 Alineamiento de secuencias nucleotídicas 48

8.6 Análisis filogénico 48

9. Perfil toxigénico de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis molecular 49

9.1 Análisis de la producción de ocratoxina A 49

9.1.1 Capacidad toxigénica 49

9.2 Análisis de la producción de fumonisinas 49

9.2.1 Capacidad toxigénica 49

9.2.2 Detección y cuantificación de FB_2 y FB_4 49

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCION I: Distribución de *Aspergillus* sección *Nigri* en diferentes regiones vitivinícolas de Argentina

1. Micoflora en uvas..... 51

2. *Aspergillus* de la sección *Nigri* en uvas..... 54

3. Identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* potencialmente ocratoxigénicas 57

4. Capacidad toxigénica de las cepas de *A.* sección *Nigri*..... 63

5 Influencia de las coordenadas geográficas sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*..... 65

6. Influencia de los factores ambientales sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*..... 66

7. Influencia de las prácticas de manejo en los viñedos sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*..... 71

7.1 Sistemas de conducción..... 71

7.2 Tipo de suelo y sistemas de riego..... 73

8. Incidencia natural de ocratoxina A en uvas..... 74

8.1 Variedades de uvas..... 75

9. Incidencia natural de ocratoxina A en vinos..... 77

10. Efectos de *Planococcus ficus* sobre la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de ocratoxina A en uvas..... 79

10.1. Micoflora aislada de uvas..... 79

10.2 Incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri*..... 81

10.3 Ocratoxina A en uvas dañadas e intactas por *P.ficus*..... 83

SECCION II: Caracterización molecular de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*

1. Análisis por polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados ($AFLP_s$)..... 85

2. Análisis filogenético basado sobre las secuencias de los genes de la calmodulina, β-tubulina, el factor de elongación 1α y la subunidad de la ARN polimerasa II..... 95

V. CONCLUSIONES - Perspectivas 104

VI. BIBLIOGRAFIA 106

ANEXO I - Medios de cultivo, soluciones y buffers..... 117

ANEXO II - Tablas y figuras..... 120

ANEXO III - Estadística..... 130

Trabajos científicos publicados..... 144

Índice de Tablas y Figuras

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Regiones vitivinícolas..... 4

Figura 1. Áreas vitivinícolas de Argentina evaluadas en el presente estudio..... 4

Figura 2. Morfología de las colonias de las especies *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger*..... 8

Tabla 2. Clasificación de *Aspergillus* sección *Nigri* según Frisvad y col. (2007)..... 10

Figura 3. Árbol filogenético basado en el secuenciamiento de la calmodulina de *Aspergillus* sección *Nigri*..... 10

Figura 4. Estructura química de la ocratoxina A..... 13

Tabla 3. Efectos biológicos de la ocratoxina A..... 14

Figura 5. Estructura química de las fumonisinas B_1, B_2, B_3, B_4 y B_6..... 16

Tabla 4. Efectos biológicos de las fumonisinas..... 17

Figura 6. Factores que afectan la incidencia y el crecimiento de *Aspergillus* spp. en los viñedos y la formación de ocratoxina A en las uvas..... 20

Figura 7. Ciclo de vida de *Planococcus ficus*..... 23

Figura 8. Esquema de la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción generados a partir de ADN genómico..... 26

Figura 9. Estructura genómica del ADN ribosomal (ADNr)..... 28

Figura 10. Estructura genómica de los genes codificantes de proteínas y de los cebadores utilizados para el estudio filogenético..... 29

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 11. Esquema de muestreo en el viñedo..... 33

Tabla 5. Localización de las regiones vitivinícolas evaluadas..... 34

Tabla 6. Características de las variedades de uvas..... 34

Tabla 7. Sistemas de conducción utilizados en Argentina..... 34

Tabla 8. Sistemas de riego en los viñedos..... 35

Figura 12. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos..... 36

Figura 13. Desarrollo de los marcadores moleculares por AFLP. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida..... 42

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN I: Distribución de *Aspergillus* sección *Nigri* en diferentes regiones vitivinícolas de Argentina.

Figura 14. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2007/08..... 52

Figura 15. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2008/09..... 53

Figura 16. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2009/10..... 53

Figura 17. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2010/11..... 54

Figura 18. *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina..... 55

Figura 19. Incidencia de las poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri*, *Alternaria* y las levaduras en las diferentes regiones vitivinícolas..... 56

Figura 20. Análisis de componentes principales de los porcentajes de infección de *Aspergillus* sección *Nigri* vs los datos meteorológicos..... 56

Figura 21. Colonias de las especies del agregado *Aspergillus niger, Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus* uniseriados..... 58

Tabla 9. Índice de diversidad de Shannon-Wiener..... 59

Figura 22. Especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10 y 20010/11..... 60

Figura 23. Cromatograma de ocratoxina A producida por una cepa de *Aspergillus carbonarius* desarrollada en el medio de cultivo agar Czapex extracto de levadura..... 62

Tabla 10. Producción de ocratoxina A por las cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*..... 63

Figura 24. Coeficientes de correlación de Pearson entre las coordenadas geográficas, la altitud y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*..... 65

Figura 25. Análisis de Componentes Principales de los condiciones meteorológicas registradas previo a la cosecha vs los porcentajes de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de OTA producidos..... 67

Tabla 11. Correlación entre los parámetros meteorológicos y los niveles de ocratoxina A producidos por la especie *Aspergillus carbonarius*, independientemente de la vendimia evaluada..... 68

Tabla 12. Correlación entre los parámetros meteorológicos y los niveles de ocratoxina A producidos por las especies del agregado *Aspergillus niger*, independientemente de la vendimia evaluada..... 68

Tabla 13. Correlación entre los parámetros meteorológicos y los niveles de ocratoxina A producidos por las especies del agregado *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius* durante todas las vendimias evaluadas..... 69

Figura 26. Diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* bajo los diferentes sistemas de conducción..... 72

Figura 27. Diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* bajo los diferentes sistemas de riego..... 73

Tabla 14. Contaminación natural de ocratoxina A en uvas..... 75

Figura 28. Incidencia de *Aspergillus carbonarius* en distintas variedades de uvas..... 76

Tabla 15. Contaminación natural de ocratoxina A en vinos..... 78

Figura 29. Micoflora aislada de uvas intactas y dañadas por *Planococcus ficus* durante la vendimia 2006/07..... 80

Figura 30. Micoflora aislada de uvas intactas y dañadas por *Planococcus ficus* durante la vendimia 2008/09..... 80

Figura 31. Porcentaje de bayas colonizadas por *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas infectadas por *P. ficus* e intactas..... 82

Figura 32. Huellas de inóculo diseminado en medio de cultivo DRBC por hormigas recolectadas de los racimos de uvas infectados por *Planococcus ficus*..... 83

Tabla 16. Niveles de ocratoxina A en uvas intactas y dañadas..... 84

SECCIÓN II: caracterización molecular de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Figura 33. Gel de poliacrilamida obtenido de la combinación TG/CG. Bandas monomórficas y polimórficas..... 86

Figura 34. Dendrograma obtenido por AFLP evidenciando la biodiversidad molecular de cepas representativas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de Argentina durante las vendimias 2006/07 y 2007/08..... 89

Tabla 17. Origen y producción de ocratoxina A por las cepas de Aspergillus sección Nigri incluidas en el análisis por AFLP..... 90

Figura 35. Dendrograma obtenido por AFLP evidenciando la biodiversidad molecular de cepas representativas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de Argentina durante la vendimia 2009/10..... 92

Tabla 18. Origen y producción de ocratoxina A por las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis por AFLP..... 93

Figura 36. Amplificación del gen de la β-tubulina (*benA*) en un gel de agarosa al 0,8%..... 95

Figura 37. Amplificación del gen de la calmodulina (*caM*) en un gel de agarosa al 0,8%..... 95

Figura 38. Amplificación del gen del factor de elongación 1α (*ef-1α*) en un gel de agarosa al 0,8%..... 96

Figura 39. Amplificación del gen de la subunidad de la ARN polimerasa II (*rpb2*) en un gel de agarosa al 0,8%..... 96

Figura 40. Árbol filogenético consenso..... 98

Tabla 19. Origen y producción de ocratoxina A/fumonisinas por las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis por secuenciamiento..... 99

γ^{33}P: isótopo radiactivo del fosforo.

µL: microlitro.

µm: micrómetro.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosomal.

AFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados.

ATP: adenosina trifosfato.

a_W: actividad de agua.

C18: carbono 18.

ClNa: cloruro de sodio.

FB: fumonisina del grupo B (B_1, B_2, B_3, B_4 y B_6).

gr: gramo.

H_2O: agua.

HPLC: cromatografía líquida de alta precisión.

IGS: región espaciadora intergénica.

ITS: región espaciadora interna transcripta.

kg: kilogramo.

L: litro.

m/z: masa-carga.

Me(OH): metanol.

mg: miligramo.

mL: mililitro.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

N_2: nitrógeno gaseoso.

$NaHCO_3$: bicarbonato de sódio.

ng: nanogramo.

OTA: ocratoxina A.

pb: pares de bases.

PCR - RT: reacción en cadena de la polimerasa – reversa transcriptasa.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: polietilenglicol.

RAPD: polimorfismo en el ADN amplificado al azar.

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

UV: luz ultravioleta.

v/v: volumen en volumen.

V: voltio.

RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

Las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* son descriptas como la principal fuente de contaminación con ocratoxina A (OTA) en uvas y vinos. El conocimiento de los factores que inciden sobre la contaminación de las uvas por dichas especies y la producción de OTA es esencial para reducir su presencia, no sólo para mejorar la calidad de los vinos, sino también para garantizar su inocuidad. Debido a la problemática planteada, en el presente estudio se decidió determinar la incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas recolectadas en las diferentes regiones vitivinícolas de Argentina y correlacionar su distribución con las características climáticas de cada zona, determinar el perfil ocratoxigénico de las cepas aisladas y evaluar la contaminación natural con OTA en uvas y vinos. La identificación morfológica reveló que las principales especies aisladas pertenecieron al agregado *A. niger, A. carbonarius* y los *Aspergillus* uniseriados. Dichas poblaciones se confirmaron mediante la utilización de marcadores moleculares ($AFLP_s$) y el secuenciamiento de los genes de la calmodulina, la β-tubulina, el factor de elongación 1α y la subunidad de la ARN polimerasa II. Por AFLP, se diferenciaron cuatro grupos dentro de *Aspergillus* sección *Nigri*: *A. carbonarius, A. tubingensis*, agregado *A. niger* y *Aspergillus* uniseriados. El análisis filogenético demostró la presencia de seis linajes: *A. carbonarius, A. tubingensis, A. niger, A. japonicus, A. homomorphus* y *A. foetidus* agrupados en cuatro grandes grupos. Los factores climáticos, la altitud, la longitud y la latitud influyeron sobre la distribución de las especies incluidas en la sección *Nigri*. *A. carbonarius*, *A. tubingensis* y *A. niger* fueron las especies productoras de OTA. *A. niger* también fue productor de fumonisinas. Las especies se diferenciaron en su capacidad ocratoxigénica, ya que el porcentaje de cepas de *A. carbonarius* productoras de OTA y los niveles de producción fueron mayores a los observados para las cepas de *A. tubingensis* y *A. niger*. Sin embargo, *A. tubingensis* en los viñedos fue la especie dominante y su presencia contribuyó también a la contaminación con OTA en un grado variable. La temperatura fue el factor que mostró una marcada influencia sobre la incidencia de *A. carbonarius* en las regiones de La Rioja y San Juan. El sistema de conducción de los viñedos en parral y el riego por goteos también influyeron sobre su aislamiento. Los niveles de OTA detectados en las uvas y los vinos fueron bajos, sin embargo se demostró que el daño producido en las bayas por *Planococcus ficus* afectó, tanto la incidencia de las especies ocratoxigénicas como los niveles de OTA en las uvas. La variedad de la uva fue importante en la susceptibilidad a la infección fúngica y en los niveles de OTA detectados.

Abstract

Aspergillus section *Nigri* are described as the main source of ochratoxin A (OTA) contamination in grapes and wine worldwide. Knowing the factors affecting the grapes contamination for species included in this section and OTA production is essential to reduce their presence, not only to improve the wine quality, also to ensure their safety. Therefore, the aims of this study were to determine the incidence of *Aspergillus* section *Nigri* species harvested in different grapes-growing regions from Argentina, their ability to produce OTA, to correlate the meteorological condition and the geographic coordinates with their prevalence and to evaluate the OTA natural occurrence in grapes and wines. The morphological identification showed that *A. niger* aggregate species were the most prevalent, followed by *A. carbonarius* and *Aspergillus* uniseriate.These populations were confirmed using AFLP markers and sequences of genes encoding calmodulin, β-tubulin, the second largest subunit of RNA polymerase II and translation elongation factor 1 alpha. The AFLP results showed that *Aspergillus* section *Nigri* populations were represented mainly by four well-defined groups including *A. carbonarius, A. tubingensis, A. niger* aggregate and *A.* uniseriate. The phylogenetic analysis showed the presence of six lineages: *A. carbonarius, A. tubingensis, A. niger, A. japonicus, A. homomorphus* and *A. foetidus* grouped in four major clusters. Climatic factors, altitude, longitude and latitude influenced on the distribution of species included in the section. *A. carbonarius, A. tubingensis* and *A. niger* were OTA producers. *A. niger* was also fumonisin producer. These species differ in their OTA producing ability, because the percentage of *A. carbonarius* OTA-producing strains and the levels produced were higher than those reported for *A. tubingensis* and *A. niger* strains. However, in the vineyards *A. tubingensis* was the dominant species within the section *Nigri*, and its presence can also contributed to OTA contamination in a varying degree. Temperature was the factor that most influenced the highest incidence of *A. carbonarius* in La Rioja and San Juan regions. The conduction system in the vineyards and drip irrigation also influenced the species isolation. The OTA levels detected in grapes and wines were low, however it was shown that the skin damage berries by *Planococcus ficus* affected the incidence of ochratoxigenic species and OTA contamination in grapes. Finally, also the grape variety was important in susceptibility to fungal infection and OTA levels.

INTRODUCCION

1. Vitivinicultura en la Argentina.

La **vid** (*Vitis vinifera* L.) es una planta de la familia de las vitáceas, originaria de Asia y se cultiva en las regiones templadas. Las uvas son cosechadas en un estado de madurez adecuado, el cual determina las propiedades químicas y físicas del vino obtenido a partir de ellas. Otras condiciones pre-cosecha que afectan la composición química de las uvas y el vino incluyen el clima, la exposición solar, el suelo, la utilización de fertilizantes, la disponibilidad de agua, la edad del viñedo y la utilización de funguicidas e insecticidas.

En nuestro país la vitivinicultura representa una de las actividades económicas más relevantes y se desarrolla en la región andina, con una gran amplitud latitudinal de norte a sur, abarcando todas las zonas templadas. Argentina se ubica entre los primeros productores de vinos a nivel mundial, conjuntamente con otros países tales como Francia, Italia, España y Estados Unidos. La industria vitivinícola nacional aporta un ingreso anual creciente de divisas, que durante la vendimia 2010/11 fue de 64 millones de dólares (http://www.inv.gov.ar). La extensión latitudinal, combinada con la topografía de los numerosos valles andinos incluidos en la misma, condicionan grandes variaciones ecológicas, que posibilitan la clasificación de regiones vitícolas bien delimitadas. En general, las regiones se encuentran en zonas con escasas precipitaciones y baja humedad atmosférica, con inviernos bien marcados, veranos calurosos y buena insolación. La baja precipitación obliga al riego artificial a partir de ríos o agua subterránea, configurando así verdaderos oasis perfectamente delimitados y separados. La altitud varía entre los 200 m hasta los 1.800 m sobre el nivel del mar.

La zona vitivinícola en Argentina se divide en tres regiones bien diferenciadas por sus características ecológicas definidas y la diversidad de los suelos: la zona Noroeste, la zona Centro Oeste y la zona Sur (Catania y Avagnina, 2010) (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Regiones vitivinícolas.

Región	Ubicación	Principales áreas vitivinícolas
Noroeste	Sur de Salta, Catamarca, La Rioja.	**La Rioja.** Valle de Famatina. **Catamarca.** Valle de Flambalá. **Salta.** Valles Calchaquíes.
Centro Oeste	Mendoza, San Juan.	**Mendoza.** • ZARM (zona alta del río Mendoza): Lujan de Cuyo, Maipú, Guaymallén y Godoy Cruz. • NOROESTE: Junín, Lavalle, San Martín, Rivadavia, Santa Rosa y La Paz. • Valle de Uco: San Carlos, Tunuyán y Tupungato. • SUR: General Alvear y San Rafael. **San Juan.** Valle del Tulum, Valle del Ullum, Valle del Zonda, Valle del Perdenal.
Sur	Neuquén, Río Negro.	**Río Negro.** Valle Río negro (Alto y medio), valle del Río Colorado. **Neuquén.** San Patricio del Chañar.

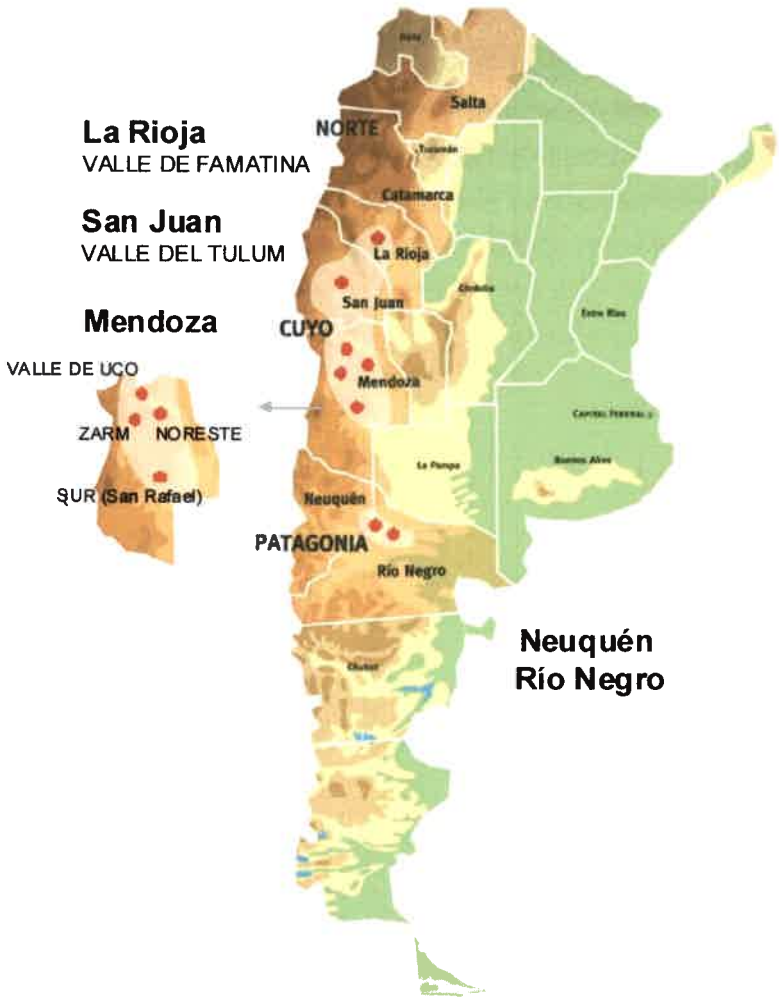


Figura 1. Áreas vitivinícolas de Argentina evaluadas en el presente estudio.

1.1 Características geográficas de las diferentes regiones vitivinícolas.

Mendoza es la principal provincia vitivinícola de la Argentina, ya que produce más del 80% del vino nacional a partir de sus más de 158.836 ha cultivadas de viñedos. Además, cuenta con una amplia gama de variedades de uvas, gracias a las notables altitudes de la zona y a la diversidad de las condiciones resultantes.

La geografía vitivinícola básica mendocina se puede dividir en cuatro grandes oasis: uno ubicado al noreste, en la cuenca de los ríos Mendoza y Tunuyán, otro en el noroeste (Valle de Uco), otro en el centro (ZARM), y otro en el sur, bañado por los ríos Diamante y Atuel.

La región **Noreste de Mendoza** comprende las áreas de menor altura sobre el nivel del mar (600-700 m), abarcando superficies vitícolas de los departamentos Lavalle, Las Heras, Guaymallén y San Martín, irrigadas por el río Mendoza. Los suelos en su gran mayoría son poco profundos, de poca pendiente y algo salinos, lo que demanda la implementación de sistemas de drenaje para efectuar lavados que mantengan un bajo nivel de sales. El clima es templado cálido, la temperatura media es de 25,4°C en el mes más cálido y de 7,2°C en el mes más frío, lo que permite una buena maduración de las uvas.

La Zona Alta del Río Mendoza (ZARM) de condiciones ecológicas extraordinarias para la vitivinicultura, corresponde al área históricamente conocida como "Primera Zona", muy prestigiada por la calidad de sus vinos. Comprende los departamentos de Luján de Cuyo, Maipú, Guaymallén y Godoy Cruz. La altitud varía entre los 650 y 1060 m sobre el nivel del mar. Los suelos son muy aptos para el cultivo de la vid, francos a franco-arcillosos con bastante material grueso (grava y canto rodado). Tienen muy buena permeabilidad y son pobres en materia orgánica y sin problemas de salinidad. La irrigación se realiza utilizando el agua del río Mendoza. El clima es templado, variando de templado frío a templado cálido, según se avanza de sur a norte, es adecuado para la óptima maduración de las uvas.

Valle de Uco esta ubicado al sudoeste de la ciudad de Mendoza, y abarca territorios cultivados de los departamentos de Tunuyán, Tupungato y San Carlos, sobre el pedemonte de la Cordillera de los Andes. La altitud varía entre los 900 y 1400 m sobre el nivel del mar. Los terrenos cultivados con viñedos son irrigados por los ríos Tunuyán y Tupungato. A causa de su composición física y mecánica los suelos son muy permeables, sin problemas de drenaje ni salinidad en su gran mayoría. Los inviernos son rigurosos y los veranos cálidos con días templados o cálidos y noches muy frías. La amplitud térmica diaria es de unos 15°C, lo que favorece una muy buena producción de color y tanino en las uvas y permite disponer de materia prima adecuada para obtener vinos destinados a una crianza prolongada.

La región **Sur de Mendoza** comprende los viñedos de los departamentos de San Rafael y General Alvear. Este oasis está irrigado por los ríos Atuel y Diamante y se ubica al pie de la cordillera principal. La altitud varía entre los 450 y 800 m sobre el nivel del mar. En general, clima es templado con intensa luz solar, reducida nubosidad, vientos moderados y bajo porcentaje de humedad relativa. Los suelos son aluviales, presentando gran proporción de calcáreo, y con frecuencia, el subsuelo es pedregoso.

San Juan es la segunda provincia productora de vinos de la Argentina, tanto en términos de superficie de viñedos (48.983 ha) como en volumen total de producción. Cuenta con una sucesión de valles, entre los que se encuentran los valles del Tulum (el valle de mayor importancia, ubicado a orillas del río San Juan) Ullum-Zonda, Calingasta, Jáchal, Iglesia y Fértil. Las altitudes oscilan entre los 600 m en los distritos más bajos del Valle del Tulum y los 1200 m en el Valle del Pedernal (valle pequeño dentro del Ullum-Zonda).

En el **Valle del Tulum**, el clima es cálido, de gran estabilidad y las lluvias son escasas. Predominan vientos generalmente suaves, pero en primavera suele soplar el viento Zonda, muy seco y caliente. Si el viento sopla en la época de la floración o el cuaje de las uvas, suele producir serios daños en los viñedos, no sólo por la elevada temperatura que puede alcanzar el aire, sino por los bajos índices de humedad que se registran simultáneamente. La región del Valle del Pedernal es una zona vitivinícola nueva y con muy buenas condiciones ecológicas para la producción de vinos de alta calidad. El clima se caracteriza por veranos templados con noches muy frescas.

En la provincia de **La Rioja** hay algunas zonas pequeñas y aisladas en las que se producen volúmenes importantes de vinos y, los de mayor calidad, provienen de la región del Valle de Famatina. Este valle se sitúa entre las cadenas montañosas de la Sierra de Velasco y Sierra de Famatina. Al igual que el resto de las regiones vitivinícolas de Argentina, en esta zona el clima es seco semiárido, relativamente ventoso, con escasa humedad y fuerte radiación solar; los veranos son muy calurosos, con temperaturas que pueden superar los 40°C. Los suelos son aluviales y por lo general se encuentran en valles de gran antigüedad geológica. Las altitudes son, sin duda, notables, ya que oscilan entre los 800 y 1400 sobre el nivel del mar.

En el extremo sur del área vitivinícola se encuentran las zonas conocidas como **Valle de Río Negro** y **San Patricio del Chañar** (Neuquén). Es un extenso valle que nace en la confluencia de los ríos Neuquén y Limay para formar el Río Negro. De todas las regiones vitivinícolas de Argentina es la de menor altitud. El clima es continental, fresco y seco con una apreciable amplitud térmica. La mejor característica de la zona es la presencia de vientos fuertes que generan la sequedad del ambiente y ayudan a evitar la propagación de las enfermedades. Se distinguen suelos en bardas, arenosos y limosos, los cuales son jóvenes y aluviales. La gran amplitud térmica, particularmente en otoño durante el periodo

de maduración de las uvas, hace posible que maduren lentamente y desarrollen una mejor acumulación de sabores y azúcares.

Dada la extensión del cultivo de la vid en Argentina, diversos microclimas se desarrollan en las diferentes zonas. Estas variaciones climáticas junto con otras variables como altitud, tipo de suelo, variedades de uvas, prácticas culturales desarrolladas en los viñedos, etc., pueden favorecer, en menor o mayor grado, el desarrollo de hongos filamentosos en las uvas. La presencia de dichos hongos impacta significativamente en la producción y en la calidad del vino, causando cambios en el "flavor" y produciendo los tintes desagradables en los vinos por la contaminación de los barriles y los tanques (Visconti y col., 2008). Entre las especies fúngicas que pueden colonizar las uvas se encuentran las pertenecientes al género *Aspergillus*, sección *Nigri*. Dichas especies tienen una distribución mundial como saprófitos del suelo y se presentan comúnmente en los viñedos. Tienen la capacidad de causar podredumbre de las uvas, tanto tintas como blancas, conocida como podredumbre por *Aspergillius*. En los últimos años dicha contaminación ha adquirido mayor interés debido a que las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* se han señalado como las principales productoras de ocratoxina A (OTA) en uvas (Abarca y col., 2001; Visconti y col., 2008). Además, se ha demostrado que *Aspergillus niger* sensu stricto tiene la capacidad de producir fumonisinas (FB_s) y su presencia puede representar un nuevo riesgo toxicológico. La producción de fumonisinas ha sido recientemente demostrada por varias cepas aisladas de granos de café y uvas, y también, se ha observado la contaminación natural con FB_2 en mosto y vino (Frisvad y col., 2007; Logrieco y col., 2009, 2010; Noonim y col., 2009; Mogensen y col., 2010a).

2. El genero *Aspergillus*.

El genero *Aspergillus* fue descrito en 1729 por Micheli e incluye una gran familia de especies fúngicas que ocupan diversos nichos ecológicos. Tradicionalmente, el genero *Aspergillus* se incluía dentro de los *Deuteromycetes* (suborden *Deuteromycotina*) u "hongos imperfectos", porque no se conocía la forma sexual o teleomórfica de sus especies. Actualmente, se incluye dentro del Phylum *Ascomycota*, orden *Eurotiales*, familia *Trichocomaceae* y, aproximadamente un tercio de las especies descritas poseen forma sexual conocida y se agrupan principalmente dentro de los géneros *Eurotium* y *Emericella* (Hibbet y col., 2007; Geiser, 2008).

La primera monografía del genero *Aspergillus* publicada describía 150 especies, clasificadas en 18 grupos (Raper y Fennell, 1965). La clasificación estaba basada en la identificación de las diferentes especies mediante la observación de sus características

morfológicas, macro y microscópicas, tales como la morfología de la colonia y pigmentación, tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y la presencia de células de Hulle. Posteriormente, Gams y col. (1985) revisaron el trabajo inicial realizado por Raper y Fennel y adaptaron las especies descritas al Código Internacional de Nomenclatura Botánica, reclasificando el género e incluyendo la sección *Nigri* dentro del subgénero *Circumdati*.

El número de especies de *Aspergillus* reconocidas se ha ido modificando en base a la construcción de filogenias utilizando marcadores bioquímicos y moleculares, y a la aplicación del concepto filogenético de especie (Pitt, 2000; Samson, 2000, 2006). Recientemente, se han descrito más de 40 taxones nuevos dentro del género y se incluyen aproximadamente 250 especies (Geiser y col., 2007).

2.1 *Aspergillus* sección *Nigri*.

Tradicionalmente la clasificación de las especies incluidas en *Aspergillus* sección *Nigri* se basaba en las características morfológicas. El carácter unificador de los miembros de esta sección era el color oscuro de sus conidios (Figura 2). En 1934 Mosseray describió 35 especies de *Aspergillus* negros, pero la clave taxonómica descripta para la identificación de las especies era poco práctica por la gran cantidad de características consideradas. Raper y Fennell en 1965, elaboraron una monografía más completa y redujeron a 12 el número de especies dentro del grupo que ellos denominaron como grupo *A. niger*. Posteriormente, Al-Musallam (1980) realizó nuevos aportes a la taxonomía dividiendo al grupo *A. niger* en dos especies, *A. foetidus* y *A. niger*, que fueron a la vez subdivididos en siete variedades. En 1989, Kozakiewicz sugirió 17 taxones en el grupo *A. niger*, y distinguió dos grupos dependiendo de las ornamentaciones equinuladas y verrugosas de sus conidios.

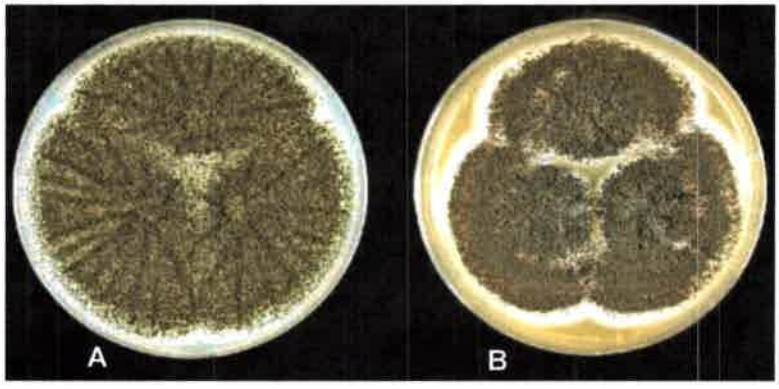


Figura 2. Morfología de las colonias de las especies *Aspergillus carbonarius* (A) y *Aspergillus niger* (B), desarrolladas en agar extracto de malta (MEA) a 25 °C durante 7 días.

Mediante la introducción de herramientas moleculares, el número de especies incluidas dentro de la sección fue reducido de 13 a únicamente 6 especies, tales como *A. japonicus, A. carbonarius, A. heteromorphus, A. ellipticus* y el "agregado" *A. niger*, que incluyó las especies *A. niger* y *A. tubingensis* (Kusters-van Someren y col., 1990, 1991; Samson, 1992, 1994; Pitt y col., 2000). Otros autores han sugerido con fines prácticos la separación de los miembros de la sección *Nigri* en tres grupos: aquellos con cabezas conidiales uniseriadas, biseriadas y *A. carbonarius* (Battilani y col., 2003a).

Las diferencias en el número de especies reconocidas por diferentes autores demuestra las dificultades en el establecimiento de criterios claros para la identificación de las especies incluidas en la sección. Abarca y col. (2004) realizaron una revisión amplia de la sección *Nigri*, describiendo la problemática taxonómica y la importancia de las distintas especies descritas hasta ese momento. En el mismo año, Samson y col. describieron cuatro nuevas especies, aceptando un total de 15 taxones: *A. aculeatus, A. brasiliensis, A. carbonarius, A. costaricaensis, A. ellipticus, A. japonicus, A. foetidus, A. heteromorphus, A. homomorphus, A. lacticoffeatus, A. niger, A. piperis, A. sclerotioniger, A. tubingensis* y *A. vadensis*. Los autores basaron la diferenciación entre las distintas especies en los perfiles de 8 metabolitos secundarios y en algunas características morfológicas. Otras especies han sido descriptas posteriormente, tales como *A. ibericus*, *A. uvarum, A. sclerotiicarbonarius* y *A. aculeatinus* (Serra y col., 2006a; Noonim y col., 2008; Perrone y col., 2008). Un resumen de la clasificación de la sección *Nigri* ha sido propuesto por Samson y col. (2007), donde se recopilan los métodos más utilizados en el diagnóstico de las especies conocidas y aceptadas. Algunos métodos adicionales son incluidos en Frisvad y col. (2007), quienes proponen la clasificación de los *Aspergillus* negros basada en las características morfológicas, fisiológicas y químicas dando como resultado una agrupación similar a la obtenida previamente mediante el secuenciamiento de la β-tubulina (Samson y col., 2004; Perrone y col., 2007). Por ejemplo, las especies *A. carbonarius, A. sclerotioniger, A. ibericus* y *A. sclerotiicarbonarius* se agrupan en la serie sugerida como "Carbonaria" debido a que tienen conidios relativamente grandes de pared rugosa, una tasa de crecimiento relativamente baja a 37 °C, producción moderada de ácido cítrico y otras características en común y, al mismo tiempo pertenecen al mismo clado de acuerdo a la secuencia de la β-tubulina (Tabla 2).

Varga y col. (2011) describieron cuatro especies nuevas: *A. eucalypticola, A. neoniger, A. idologenus* y *A. fijiensis*, y revalidaron las especies *A. acidus* (Kozakiewicz, 1989), *A. violaceo fuscus* (Gasperini, 1887), *A. coreanus* (Tae Yu y col., 2004) y *A. saccharolyticus* (Sorensen y col., 2011), incluyendo un total de 26 taxas divididas en cinco clados principales dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* (Figura 3).

Tabla 2. Clasificación de *Aspergillus* sección *Nigri* según Frisvad y col. (2007).

Serie *Nigri*	**Subserie *Nigri***	*Aspergillus niger* *Aspergillus lacticoffeatus* *Aspergillus brasiliensis*
	Subserie *Tubingensis*	*Aspergillus tubingensis* *Aspergillus vadensis* *Aspergillus foetidus* *Aspergillus piperis* *Aspergillus costaricaensis*
Serie *Carbonaria*	*Aspergillus carbonarius* *Aspergillus sclerotioniger* *Aspergillus ibericus* *Aspergillus sclerotiicarbonarius*	
Serie *Heteromorpha*	*Aspergillus heteromorphus* *Aspergillus ellipticus*	
Serie *Homomorpha*	*Aspergillus homomorphus*	
Serie *Aculeata*	*Aspergillus aculeatus* *Aspergillus aculeatinus* *Aspergillus uvarum* *Aspergillus japonicus*	

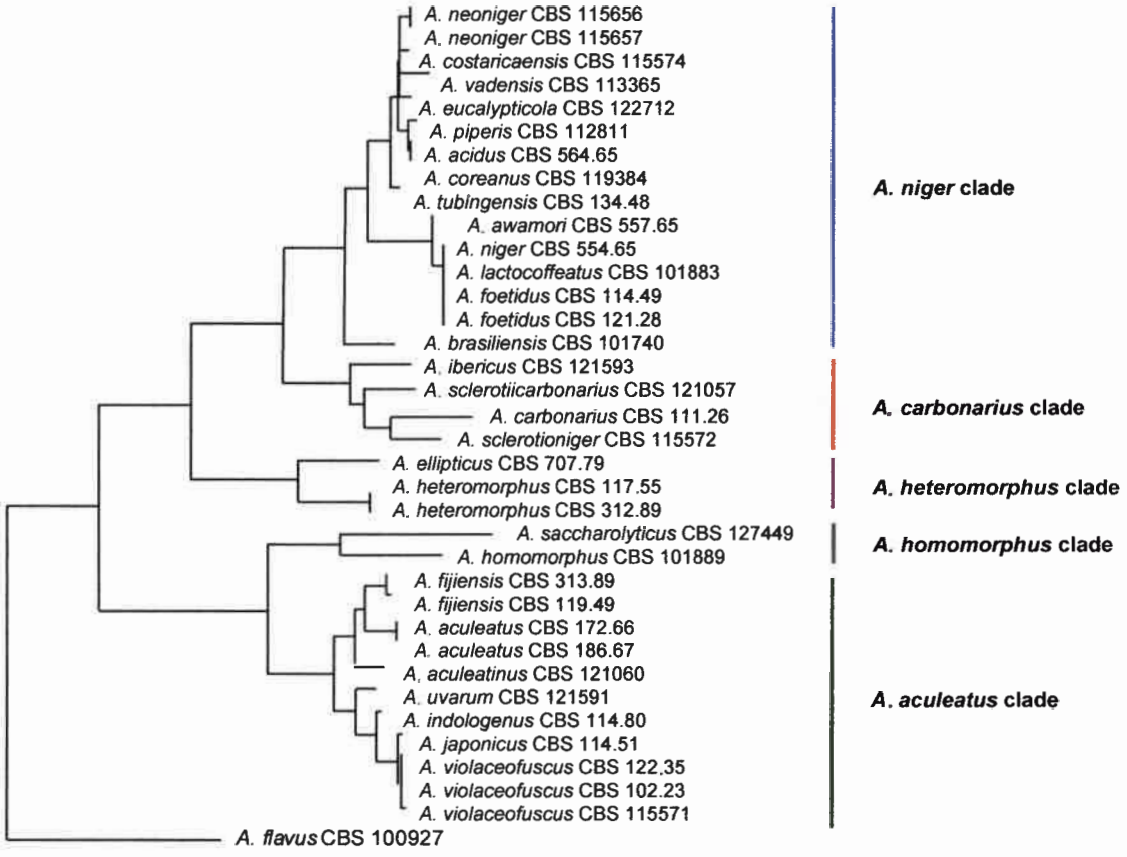


Figura 3. Árbol filogenético basado en el secuenciamiento de la calmodulina de *Aspergillus* sección *Nigri* (Varga y col., 2011).

2.2 Especies biseriadas.

Entre la especies biseriadas incluidas en *Aspergillus* sección *Nigri* se encuentran: *A. ibericus, A. sclerotiicaronarius, A. carbonarius, A, sclerotioniger, A. ellipticus, A. heteromorphus, A. sacchraolyticus, A. homomorphus* y el agregado *A. niger*. Dichas especies se aislan de diferentes sustratos; por lo tanto, sólo las que se aislan principalmente en uvas se describen a continuación:

2.2.1 *Aspergillus carbonarius.*

Dentro de la sección *Nigri*, *Aspergillus carbonarius* se diferencia claramente del resto de las especies debido a sus características morfológicas, tales como sus conidios de gran tamaño y ornamentación equinulada. Las técnicas de $RFLP_s$ del ADNr y ADNmt, $RAPD_s$, $AFLP_s$ y el secuenciamiento de diferentes genes permiten diferenciar claramente *A. carbonarius* del resto de especies del agregado *A. niger* (Varga y col., 2000; Gonzalez-Salgado, 2005; Perrone y col., 2006a; Samson y col., 2007). La correcta identificación de *A. carbonarius* es relevante debido a que es una de las principales especies responsables de la contaminación con ocratoxina A en uvas, no sólo por el alto porcentaje de cepas productoras (98-100%) sino también por los niveles elevados de producción detectados (Battilani y col., 2006a).

2.2.2 *Aspergillus ibericus.*

Aspergillus ibericus es la especie fenotipicamente más similar a *A. carbonarius.* Sin embargo, su aislamiento en las uvas no es significativo en relación con la producción de OTA, debido a que dicha especie no es productora de dicha toxina. En los viñedos de Portugal, Francia, Grecia, Italia, España e Israel, *A. ibericus* se aisló con menor frecuencia en relación al agregado *A. niger* y *A. carbonarius* (Bau y col., 2005; Serra y col., 2006a). Mediante el secuenciamiento de los genes de la calmodulina y de la región ITS-5.8S del ADNr y, el análisis por AFLP, las cepas de *A. ibericus* pueden ser claramente separadas de *A. carbonarius* (Serra y col., 2006a).

2.2.3 "agregado" *Aspergillus niger.*

La diferenciación en base a la morfología de las distintas especies del agregado *A. niger* es extremadamente difícil, por lo tanto las distintas propuestas de clasificación del grupo describieron originalmente un gran número de taxones (Al-Musallam, 1980;

Kozakiewicz, 1989). Diversos estudios moleculares y bioquímicos realizados con cepas del agregado *A. niger* han intentado clarificar su clasificación. En 1991, Kusters-van Someren, mediante el uso de $RFLP_s$, dividieron al agregado en las especies *A. niger* y *A. tubingensis*, indistinguibles morfológicamente. Esta división fue confirmada en estudios posteriores (Varga y col., 1993; Accensi y col., 2001; Medina y col., 2005; Bau y col., 2006). Por el contrario, otros autores han propuesto la división del agregado en 3 especies morfológicamente idénticas: *A. niger, A. tubingensis* y *A. foetidus* (Perencicová y col., 2001; Yokoyama y col., 2001; Abarca y col., 2004; De Vries y col., 2004). Sin embargo, no hay un consenso sobre los resultados obtenidos en todos los estudios realizados. En los últimos años, la opción más prometedora para caracterizar a las especies es el desarrollo de un enfoque polifásico. Cualquier método de caracterización molecular puede dar resultados ocasionales sin ambigüedades, pero en conjunto la identificación morfológica y la utilización de marcadores bioquímicos (perfil de extrolitos) y moleculares resultan muy eficaces para describir a las especies e identificar nuevas (Samson y col., 2006, 2007; Geiser y col., 2007).

Actualmente, dentro del el agregado *A. niger* se incluyen 10 especies biseriadas y se dividen en tres subclados en base al secuenciamiento de los genes de la β-tubulina y calmodulina: *A. tubingensis* (*A. tubingensis, A. vadensis, A. piperis, A. acidus, A. costaricaensis, A, neoniger, A. eucalypticola*), *A. niger* (*A. niger, A. awamori*) y *A. brasiliensis* (Varga y col., 2011). En base a datos moleculares y fisiológicos, *A. foetidus* y *A. lacticoffeatus* son considerados sinónimos de *A. niger* y *A. coreanus* de *A. acidus*, respectivamente.

2.3 Especies uniseriadas.

Inicialmente, algunos autores consideraron a *Aspergillus japonicus y Aspergillus aculeatus* como dos especies uniseriadas diferentes (Raper y Fennell, 1965; Kozakiewics, 1989; Pitt y Hocking, 1997), mientras que otros autores incluyeron dos variedades dentro de *A. japonicus*: *A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus* (All-Musallam, 1980; Klich y Pitt, 1988). El uso de marcadores moleculares ha ayudado a aclarar dicha controversia y estos taxones se han descrito como especies diferentes (Samson y col., 2004; Serra y col., 2006a; Samson y col., 2007). Recientemente, nuevas especies uniseriadas se han descrito dentro de la sección *Nigri*: *Aspergillus aculeatinus*, *Aspergillus uvarum, Aspergillus fijensis*, *Aspergillus indolagenus, Aspergillus violaceofuscus* (Noonim y col., 2008; Perrone y col., 2008, Varga y col., 2011). Dentro de este grupo, sólo las especies *A. japonicus, A. aculeatus* y *A. uvarum* han sido aisladas de uvas.

3. Ocratoxinas.

Las ocratoxinas constituyen, luego de las aflatoxinas, el primer grupo mayoritario de micotoxinas que contaminan tanto materias primas como alimentos elaborados (Bragulat y col., 1998). En dicho grupo se encuentra la ocratoxina A (OTA), que es una de las micotoxinas más estudiadas y la más tóxica dentro del grupo de las ocratoxinas. La OTA es un producto cristalino e incoloro con características de ácido débil, que emite fluorescencia al ser excitado con luz UV (Monaci y Palmisano, 2004). Químicamente, es una isocumarina unida a un residuo de fenilalanina ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) (Figura 4) (Moss, 1996).

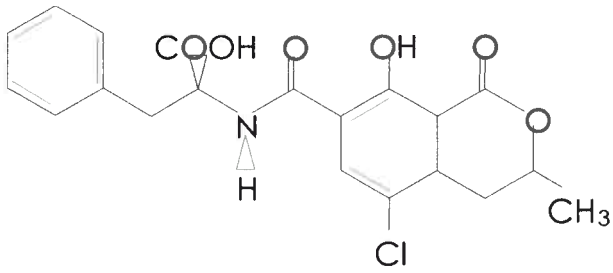


Figura 4. Estructura química de la ocratoxina A.

La ocratoxina B (OTB) es el derivado no clorado de la OTA y es significativamente menos tóxica tanto *"in vivo"* como *"in vitro"*. La ocratoxina C (OTC) es el éster de la OTA y su posible potencial tóxico, aunque se considera prácticamente nulo, se ha descripto sobre algunas líneas celulares de monocitos en el hombre (O`Brien y Dietrich, 2005). La ocratoxina α (OTα) y la ocratoxina β (OTβ) son productos de la hidrólisis de la OTA y OTB, respectivamente. Estas toxinas no poseen la molécula de la fenilalanina y no se consideran tóxicas (Kuiper Goodman y Scott, 1989; O`Brien y Dietrich, 2005). La OTα se ha detectado en la orina de animales de experimentación a los que se les había administrado OTA (Storen y col., 1982; Screemannarayana y col., 1988).

3.1 Toxicidad.

La OTA se encuentra ampliamente distribuida como contaminante natural de una gran cantidad de alimentos y bebidas, como cereales, oleaginosas, legumbres, café, vinos, entre otros (Majerus y Otteneder, 1996; Serra y col., 2003; Magan y Olsen, 2004). La utilización de uvas contaminadas con OTA puede dar lugar a la presencia de dicha toxina en sus productos derivados como el jugo de uva, las pasas de uvas y el vino. Desde la primera descripción de OTA en vinos y zumo de uvas por Zimmerli y Dick (1995), se han llevado a cabo diferentes estudios en varios países, principalmente en Europa.

El consumo de alimentos contaminados con OTA se ha asociado con la nefropatía endémica de los Balcanes, una enfermedad renal fatal asociada al desarrollo de tumores en el tracto urinario en humanos (Castegnaro y col., 1991; Peraica y col., 2001). Estudios más recientes aportan evidencias sobre las posibles asociaciones de esta toxina a patologías renales en humanos en varios países (Puntaric y col., 2001; Pfohl-Leszkowicz y col., 2002). La Agencia Internacional del Cáncer ha clasificado a la ocratoxina A en el grupo 2B, como posible carcinógeno para humanos (IARC, 1993) por lo tanto la contaminación de los alimentos posee un riesgo considerable para el consumidor.

La carcinogenicidad de OTA ha sido establecida en roedores en estudios a largo plazo, siendo el riñón el sitio principal y el hígado el sitio secundario de formación de tumores. Recientes investigaciones han demostrado que OTA además de sus propiedades nefrotóxicas, también posee propiedades immunotóxicas, genotóxicas, neurotóxicas y teratogénicas (Tabla 3). En base a los efectos tóxicos de la ocratoxina la Comisión Europea ha establecido un límite máximo admisible de contaminación con OTA de 2 μg/L en vinos (Comisión Europea, 2006).

Tabla 3. Efectos biológicos de la ocratoxina A.

Toxicidad	**Efectos**	**Animales**
Nefrotoxicidad	Cariomegalia y necrosis progresiva de las células del túbulo proximal.	Cerdos, ratas, ratones.
Neurotoxicidad	Lesiones cerebrales.	Ratas, ratones, conejos.
Inmunotoxicidad	Afecta la actividad de macrófagos, NK, LT, los niveles de IgG e IL, etc.	Ratas, cerdos,
Toxicidad reproductiva	Embriotóxica Teratogénica	Ratas, ratones, conejos.
Carcinogenicidad	Tumores renales Enfermedad endémica de los Balcanes	Humanos, ratas, ratones.
Genotoxicidad	Formación de aductos con el ADN Daño oxidativo del ADN	Ratas, ratones.

Aunque se dispone de pocos datos sobre la farmacocinética de la OTA en el hombre, se conoce que se metaboliza lentamente y tiene una vida media de aproximadamente 35,5 días (Studer-Rohr y col., 2000), lo que supone que una vez ingerida con los alimentos, permanece en el organismo largo tiempo aumentando la probabilidad de producir toxicidad. Se une principalmente a las proteínas plasmáticas afectando la etapa post-transcripcional, actuando por inhibición competitiva de la fenilalanina-tRNA sintetasa (su mecanismo de acción es actuar en la etapa post-transcripcional afectando la síntesis proteica, por inhibición competitiva de la fenilalanina-tRNA sintetasa). La toxicidad renal específica de OTA, como

así también el daño al ADN y la genotoxicidad son atribuibles al daño celular oxidativo (JECFA, 2006).

La excreción de la OTA y sus metabolitos ocurre por la orina y las heces; también se ha comprobado que la toxina es capaz de pasar a la leche materna (Breitholtz-Emanuelsson y col., 1993). Esta posibilidad debe ser considerada ya que supone un riesgo de exposición para recién nacidos y de transmisión a productos lácteos de consumo humano.

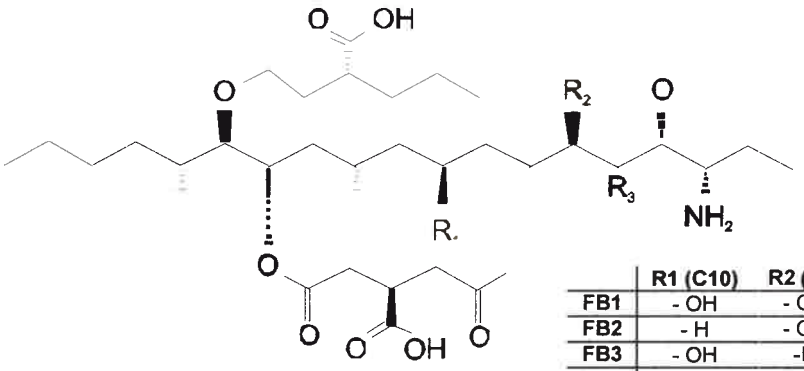
4. Fumonisinas.

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides* (formalmente conocido como *F. moniliforme*), *Fusarium proliferatum, Fusarium oxysporum, Fusarium globosum,* entre otras especies de *Fusarium,* y *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Leslie y col., 2004; Desjardins, 2006; Scott, 2011). Las fumonisinas son contaminantes comunes de maíz y alimentos a base de maíz (Weidenbörner, 2001). Recientemente se ha demostrado la producción fumonisinas por cepas de *A. niger* sensu stricto aisladas de uvas, pasas de uvas y granos de café y, se ha demostrado la incidencia natural de FB_2 en mosto, vino, cerveza y, junto con la FB_4, en café (Frisvad y col., 2007; Pel y col., 2007; Noonim y col., 2009; Romero-Gonzalez y col., 2009; Logrieco y col., 2009, 2010; Mogensen y col., 2010b; Mansson y col., 2010).

Las fumonisinas son aminopolioles cuya estructura principal consiste en una cadena lineal de 20 átomos de carbono, la cual tiene un grupo amino en el carbono 2, junto con grupos metilo, hidroxilo y ácido tricarboxílico en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado (Figura 5). Según los grupos químicos presentes a lo largo de la cadena lineal, las fumonisinas se pueden clasificar en cuatro series: fumonisinas A, B, C y P (Musser y Plattner, 1997). Las fumonisinas de la serie B son ésteres de 2-amino-12, 16-dimetil-14, 15-dihidroxiecosan y propanol-1, 2, 3-ácido tricarboxílico y son las más abundantes en maíz contaminado de manera natural. En función de la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbono 5 y 10 se distinguen los cuatro tipos, fumonisina B_1 (FB_1), fumonisina B_2 (FB_2), fumonisina B_3 (FB_3) y fumonisina B_4 (FB_4). La FB_1 tiene grupos hidroxilo en C-3, C-5, C-10, las FB_2 y FB_3 son isómeros con grupos hidroxilo en C-3, C-5 y C-3, C-10 y la FB_4 presenta un grupo hidroxilo menos que la FB_2 y la FB_3. Recientemente, una nueva fumonisina, la fumonisina B_6, ha sido aislado junto con fumonisina B_2, en cepas de *Aspergillus niger.* El análisis de datos de espectrometría de masa y RMN determinó que la FB_6 es un isómeros posicional de la FB_1 e iso-FB_1, con funciones hidroxilo en C3, C4 y C5 (Baker, 2006; Frisvad y col., 2007; Mansson y col., 2010).

Para la mayoría de las especies de *Fusarium*, la FB_1 es la fumonisina predominante y, por lo general, representa alrededor del 70% del contenido de las fumonisinas totales. La

FB_2 y la FB_3 por lo general representan un 15-25% y 3.8%, respectivamente, mientras FB_4 normalmente está presente en cantidades insignificantes (Miller, 1994; Musser y Plattner, 1997). Las cepas de *A. niger* producen sólo FB_2, FB_4 y FB_6 y en estudios previos, se ha observado que las frecuencias en la producción representan en promedio un 100%, 10-25% y 10.5%, respectivamente.



	R1 (C10)	R2 (C5)	R3 (C4)
FB1	- OH	- OH	- H
FB2	- H	- OH	-H
FB3	- OH	-H	-H
FB4	- H	-H	-H
FB6	-H	-OH	-OH

Figura 5. Estructura química de las fumonisinas B_1, B_2, B_3, B_4 y B_6.

4.1 Toxicidad.

El consumo de las fumonisinas se ha asociado con leucoencefalomalacia en los equinos, toxicidad hepática y renal en roedores, edema pulmonar en cerdos y cáncer de esófago en humanos (FAO, 2001) (Tabla 4). El mecanismo de acción de las fumonisinas se atribuye a la inhibición específica del metabolismo de los esfingolípidos, reduciendo el crecimiento celular y produciendo la acumulación de las bases esfingoides libres y la alteración del metabolismo lipídico en diversos animales de experimentación (Marasas y col., 2001). En base a los datos toxicológicos, el Comité Científico para la Alimentación de la Comisión Europea (JECFA, 2005) ha establecido un máximo tolerable provisional de ingesta diaria de 2 mg/kg de peso corporal por día para FB_1, FB_2 y FB_3, ya sea administrada en forma aislada o en combinación.

La producción de fumonisinas de la serie-B por cepas de *A. niger* ha planteado la problemática del riesgo toxicológico que ello representa para la salud, debido a la presencia ubicua de *A. niger* en un amplio rango de productos alimenticios que por lo general no se encuentran contaminados con especies de *Fusarium* (Bouras y col., 2007). Estos incluyen las uvas, las pasas de uvas, el vino, el maní, café, té, y varios productos (Frisvad y col., 2007). Además, debido a la amplia utilización de *A. niger* industrialmente para la obtención de enzimas y sustancias químicas, dichos productos podrían presentar contaminación con trazas de fumonisinas (Schuster y col., 2002; karaffa y col., 2003; Goldberg y col., 2006).

Tabla 4. Efectos biológicos de las fumonisinas.

Toxicidad	Efectos	Animales
Hepatotoxicida	Colestasis, necrosis, hiperplasia nodular, alteraciones enzimáticas.	Equinos, cerdos, ratas, ratones, aves.
Nefrotoxicidad	Necrosis tubular progresiva.	Ratas, ratones, cerdos, ovejas, aves.
Carcinogenicidad	Cáncer de esófago, tumores renales y hepáticos.	Humanos, ratas, ratones
Neurotoxicidad	Defectos en el tubo neural, leucoencefalomalacia equina.	Equinos, aves.
Inmunotoxicidad	Efectos inmunosupresivos.	Aves, cerdos.
Edema pulmonar y alteraciones cardiovasculares		Cerdos

5. *Aspergillus* sección *Nigri*: ecofisiología y producción de ocratoxina A.

Aspergillus carbonarius se distingue fácilmente de las otras especies biseriadas debido al tamaño y forma de sus conidios; y al alto porcentaje de las cepas productoras de OTA (98-100%). El crecimiento óptimo de *A. carbonarius* ocurre entre los 32 y 35°C (min. 10°C y máx. 45°C), a niveles de actividad de agua entre 0.95 y 0.98. Mientras que, las condiciones óptimas para la producción de OTA varían entre los 20 y 25°C, a niveles de actividad de agua entre 0,95 y 0,98 (Belli y col., 2005a).

El "agregado *A. niger* " incluye diez especies diferentes indistinguibles en base a sus características morfológicas. Las condiciones de crecimiento óptimas para dichas especies varían entre 35 y 37°C (min. 6-8°C y máx.47°C), a niveles de actividad de agua entre 0,93 y 0,98. Un porcentaje bajo de cepas incluidas en el agregado *A. niger* son productoras de OTA (5-10%) y las condiciones óptimas de producción varían a temperaturas entre 20-25°C y niveles de actividad de agua entre 0,95-0,98 (Esteban y col., 2004). Este grupo de especies colonizan una amplia gama de frutos frescos y secos, cereales, etc. y se consideran en la elaboración de alimentos como "GRAS" (generalmente considerados como inocuos) (Visconti y col., 2008).

Entre el grupo de *Aspergillus* "uniseriados", no se ha observado producción de OTA por dichas especies a pesar de tener condiciones de crecimiento similares a *A. carbonarius*.

6. Factores que afectan la dinámica de las poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* y la incidencia de ocratoxina A en los viñedos.

La contaminación con especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y la producción de ocratoxina A en vinos se producen previo a la cosecha y, los factores tales como las

variedades cultivadas, el clima y las prácticas de manejo tienen una marcada influencia sobre los niveles de contaminación detectados (Visconti y col., 2008).

6.1 Rol de los factores ambientales y agro-ecológicos.

La podredumbre negra de los racimos de uvas causada por los miembros de *Aspergillus* sección *Nigri*, puede producir pérdidas en las cosechas o rechazos comerciales por los niveles de contaminación fúngica. Sin embargo, dicha enfermedad adquiere relevancia cuando *A. carbonarius* y ciertas cepas de *A. niger* se reconocen como la fuente potencial de contaminación con OTA, tanto en las uvas como en los sub-productos (Heenan y col., 1998; Battilani y Pietri, 2002; Cabañes y col., 2002; Da Rocha Rosa y col., 2002; Sage y col., 2002)

En Australia se ha demostrado que en los viñedos, el suelo y los desechos de las vides sobre el suelo son la fuente primaria de inóculo de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri.* Estas especies se aíslan también ocasionalmente en las bayas secas, en las cañas muertas, en la corteza de la vid, en los tallos de racimos secos y en los restos de los cultivos; pero rara vez, se aíslan de las hojas (verdes o muertas), en los zarcillos y en la cobertura verde del cultivo. Además, se ha observado que en los viñedos hay un aumento de los propágalos de *A. carbonarius* en la superficie del suelo (0-1 cm) en comparación con los niveles más profundos, y el inóculo es mayor en el suelo debajo de las vides que en el suelo entre las vides (surcos). El aumento en la incidencia de dichas poblaciones también se observa en los suelos regularmente removidos, con niveles reducidos de humedad y temperaturas cercanas a los 25°C. Particularmente, el efecto de la humedad es más marcada en los suelos arcillosos que en suelos arenosos (Kazi y col., 2004, 2006; Leong y col., 2006a) (Figura 6).

Las esporas, los fragmentos miceliales y los esclerocios del suelo que son transportados por el aire pueden ser depositados sobre la superficie de las bayas, iniciando el proceso de contaminación. En un estudio donde se analizaron muestras de aire de los viñedos, se observó que la incidencia de las esporas de *A. carbonarius* aumentó en aquellas muestras más cercanas al suelo. Además, el papel de movimiento de aire en la dispersión de las esporas del suelo se acentuó al comprobarse el incremento en la incidencia de *A. carbonarius* en frutos después de una tormenta severa de polvo (Kazi y col., 2004).

En Europa, Australia y Sudamérica, se ha demostrado que las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* están presentes sobre las bayas de uvas desde los primeros estadios de desarrollo y su incidencia aumenta con el crecimiento y la madurez de los frutos (Battilani y col., 2006b; Leong, 2007; Ponsone y col., 2007; Díaz y col., 2009). La superficie de las bayas inmaduras y la exposición a la luz UV representarían un ambiente hostil para el

desarrollo de las esporas fúngicas. Durante el envero, la piel de las bayas se ablanda y el contenido de azúcar aumenta, a partir de dicho estadio hasta el período de cosecha, las bayas son más susceptibles a la infección por aspergilos negros y a la producción de OTA, en particular si han sufrido daños. El retraso en la cosecha de las bayas maduras también aumenta el riesgo de la contaminación con OTA (Roset, 2003; Battilani y col., 2006c; Leong y col., 2006b, 2007). Los daños producidos en las bayas es uno de los principales factores que afectan al desarrollo de *Aspergillus* y la contaminación con OTA. Los daños pueden producirse debido a las aves, los insectos o la infección por otras especies fúngicas tales como *Botrytis cinerea* (putrefacción por *Botrytis*) o *Erysiphe necator* (mildiu pulverulento). Las precipitaciones producidas antes de la cosecha también es considerada una causa común de daño mecánico en las bayas (Leong y col., 2004, 2006b).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que algunas variedades de uvas exhiben una mayor susceptibilidad a la infección por *Aspergillus* sección *Nigri* y a la contaminación con OTA (Battilani y col., 2004a). La estructura de las bayas podría explicar la diferencia en susceptibilidad de algunas variedades al deterioro de los racimos por *Aspergillus*.

Los racimos compactos tienen mayor superficie de contacto entre bayas, lo que produce, en esta zona, una menor deposición de cutícula y ceras epicuticulares, siendo más sensibles al ataque de estos hongos (Vail y Marois, 1991). La distribución de las bayas de la variedad Sunmuscat en los racimos es menos compacta que en la variedad Sultana, lo que podría contribuir a la resistencia de dichas bayas al daño (Clarke y col., 2003). Además, los racimos compactos posiblemente atrapen más fácilmente las esporas en suspensión en el aire que aquellos de estructura menos compacta (Leong y col., 2006a). Sin embargo, la diferencias en los niveles de OTA detectados en las uvas se han asociado más frecuentemente con las variaciones estacionales del clima y con el tiempo de maduración que, con las características inherentes a la variedad (Battilani y col., 2006c; Leong y col., 2006a).

Las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* se aíslan con mayor frecuencia en determinadas regiones, durante las estaciones más cálidas y secas, y la contaminación con OTA en vinos en Europa aumenta gradualmente de Norte a Sur (Battilani y col., 2006a; Varga y Kozakiewicz, 2006; Leong, 2007). Sin embargo, en otros estudios esta tendencia se ha asociado con las temperaturas altas, el aumento de la humedad relativa y las precipitaciones en los viñedos (Roset, 2003; Belli y col., 2005a; Battilani y col., 2006a). En Australia, no se pudo correlacionar el efecto del clima de las distintas regiones vitivinícolas y la ocurrencia de *Aspergillus* sección *Nigri,* aunque la incidencia parece disminuir en las regiones más frías, como Tasmania (Leong y col., 2007).

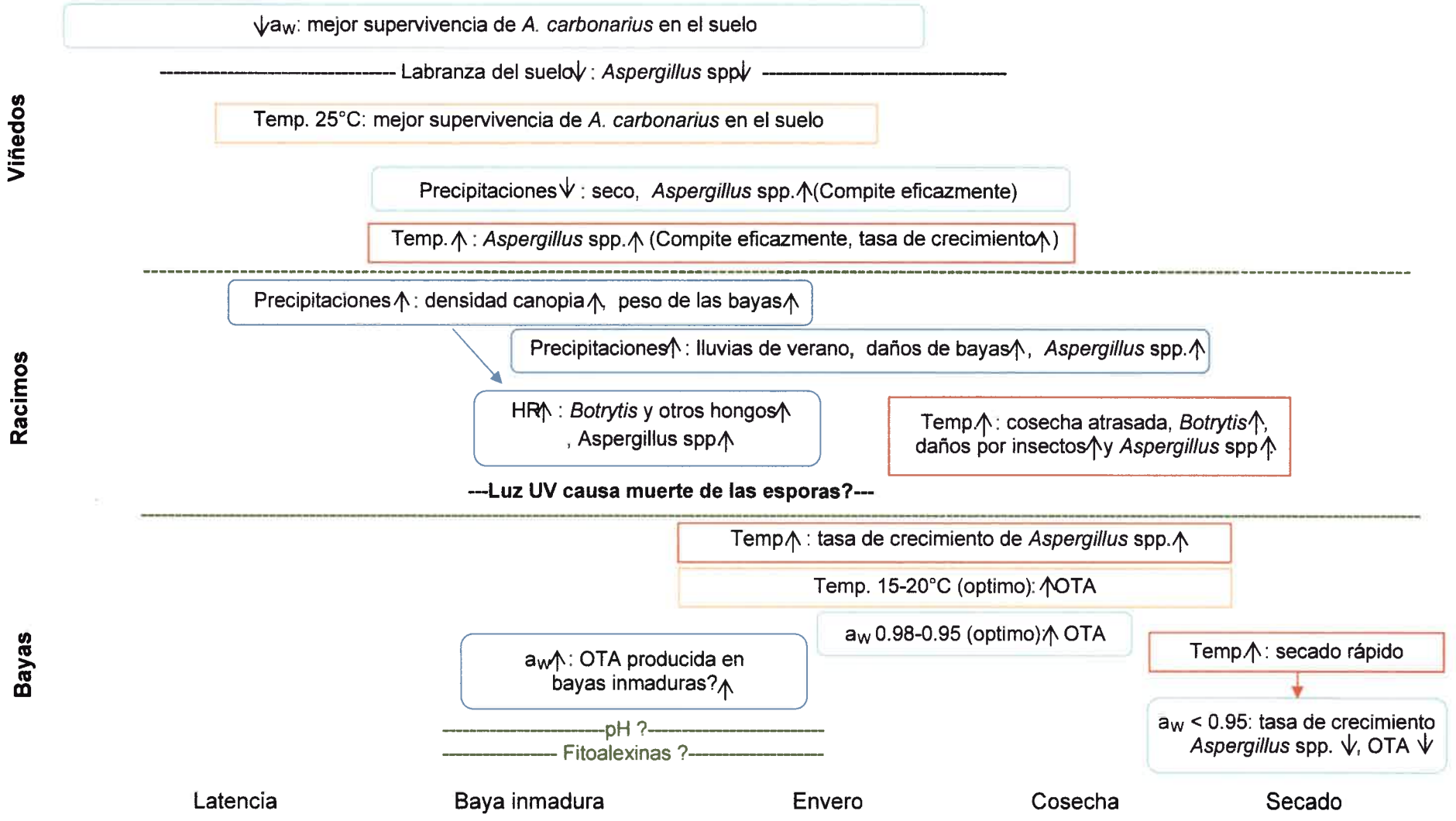


Figura 6. Factores que afectan la incidencia y el crecimiento de *Aspergillus* spp. en los viñedos y la formación de ocratoxina A en las uvas. Temp.: temperatura, HR: humedad relativa, a_W: actividad de agua,↑: incremento,↓: disminución (Kazi y col., 2004, 2006; Leong y col., 2006a; Hocking y col., 2007).

6.2 Rol de las prácticas de manejo.

6.2.1 Sistemas de conducción.

La vid es una planta perenne, leñosa, y debido a que es una liana, necesita una estructura de sostén para hacerla un cultivo racional y económicamente viable. La vid presenta una extraordinaria diversidad de arquitectura de vegetación y de estructuras perennes. Estas formas se agrupan bajo el término de sistema de conducción (Carbonneau, 1989). Cada sistema de conducción (unido a otros factores) implica para la planta la creación de condiciones micro climáticas favorables o desfavorables, que repercutirán en la calidad final del producto (uva de mesa, vino o jugo de uva concentrado).

Existen diferentes sistemas de conducción que responden a distintas exigencias respecto de las características de la producción, del clima en el que se encuentra el viñedo y también, respecto de factores culturales. En la Argentina los sistemas más utilizados son la espaldera baja, la espaldera alta y el parral.

La arquitectura de la planta y la compactación de los racimos provocan modificaciones en el microclima de la zona de los racimos y el tiempo de mojado de las bayas, lo que tiene influencia en la incidencia de las podredumbres (Smart y Robinson, 1991; Pieri y col., 2001; Pertot y col., 2007; Ferrer y col., 2008). Según estos autores, en los racimos compactos, el tiempo de mojado de las bayas es mayor, lo que favorece la más rápida propagación de focos de podredumbre. Los sistemas, como la lira, que mantienen ventilada dicha zona, muestran disminuciones de hasta el 50% del daño por podredumbres (Carbonneau y col., 1992; Smart y Robinson 1991, Egger, 1994; Ferrer y col., 2001). Phillips y col. (1990) estudiaron la influencia del tipo de poda sobre la sanidad de las uvas y demostraron que la poda Royat (poda corta) es más predisponente a los ataques de la podredumbre gris en comparación con la poda Guyot (poda larga). Esto se debe fundamentalmente a que el tipo de poda influye sobre la compactación del racimo. Para una misma variedad, los racimos con poda Royat son mas compactos que con el tipo de poda Guyot.

6.3 Rol de las plagas y enfermedades.

El buen manejo de las plagas y las enfermedades en los viñedos resulta en una disminución de los niveles de contaminación con ocratoxina A durante la cosecha, como se ha demostrado en los viñedos manejados con diferentes enfoques para la protección de los cultivos (Kappes y col., 2006).

Las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* son hongos oportunistas (saprófitos) responsables de la putrefacción secundaria de las uvas. El desarrollo es favorecido por los sitios de entrada producidos por las heridas o la ruptura de las bayas causadas ya sea por factores bióticos o abióticos (insectos, hongos, aves, lluvia, granizo). *Lobesia botrana* (*Lepidoptera: tortricidae*), es uno de los principales insectos que infectan los viñedos en el sur de Europa y se ha demostrado que las bayas dañadas por dicha especie mostraban niveles mayores de contaminación tanto por aspergilos negros como por OTA (Cozzi y col., 2006). Las larvas podrían contribuir a la dispersión de las esporas o actúar como vectores de las especies fúngicas, como se ha demostrado en *Botrytis cinerea* (Fermaud y col., 1989; Cozzi y col., 2006). Por lo tanto, es importante asegurar un adecuado control de los insectos en combinación con los tratamientos con fungicidas a fin de realizar un control efectivo de las plagas.

6.3.1 *Planococus ficus.*

La cochinilla harinosa de la vid (*Planococcus ficus* Signoret) es un insecto polífago perteneciente a la familia *Pseudococcidae*, orden *Hemiptera*. La denominación "harinosa" se debe a que en su tegumento hay glándulas que segregan material pulverulento o algodonoso de color blanco. Presenta una amplia distribución geográfica en las principales zonas vitivinícolas del mundo y su población ha aumentado en los últimos años en la provincia de Mendoza, ocasionando perjuicios a nivel económico en los viñedos (Becerra y col., 2006).

Durante el ciclo biológico, *P. ficus* pasa el invierno como huevo bajo la corteza de las vides, presenta al menos 6 generaciones, completando el ciclo - desde huevo hasta adulto - entre 30 y 60 días en función de la temperatura. Durante el invierno se refugia en los troncos pero a fines de la primavera se dirige hacia las hojas y los racimos. Además es posible encontrar esta plaga en las malezas de la zona, tanto en las raíces como en los tallos y las hojas (Becerra, 2005) (Figura 7).

Entre la gama amplia de huéspedes que ataca *Planococcus ficus*, *Vitis vinifera* Linn., es la especie más afectada. El ataque por dicha plaga disminuye el vigor general de la planta, perjudicando seriamente la calidad de los racimos. El daño es ocasionado por la succión de la savia directamente del floema, inyección de las toxinas y por la presencia abundante en todas las partes aéreas de la planta. Las deyecciones del insecto, "melazas de arrope", contienen azúcares que impregnan los frutos y son aprovechados por las hormigas que contribuyen al desarrollo de este insecto, ya que lo protegen de sus enemigos naturales y permiten el desarrollo de las especies fúngicas que desvalorizan el producto, principalmente cuando se trata de uvas para consumo en fresco. Además, *P. ficus* es

transmisor de virus que causan la disminución en los rendimientos de los viñedos (Becerra y col., 2004, 2005).

La tasa alta de reproducción y el desarrollo rápido promueve infestaciones severas, que son difíciles de controlar. Además la tendencia de *P. ficus* de alimentarse debajo de la corteza y por debajo del nivel del suelo ofrece un refugio para el contacto con los insecticidas y los enemigos naturales. Por lo tanto, el éxito del control de esta plaga se basa en limitar la propagación del material vegetal contaminado, y el control químico y biológico de las nuevas infestaciones (http:// www.inta.gov.ar).

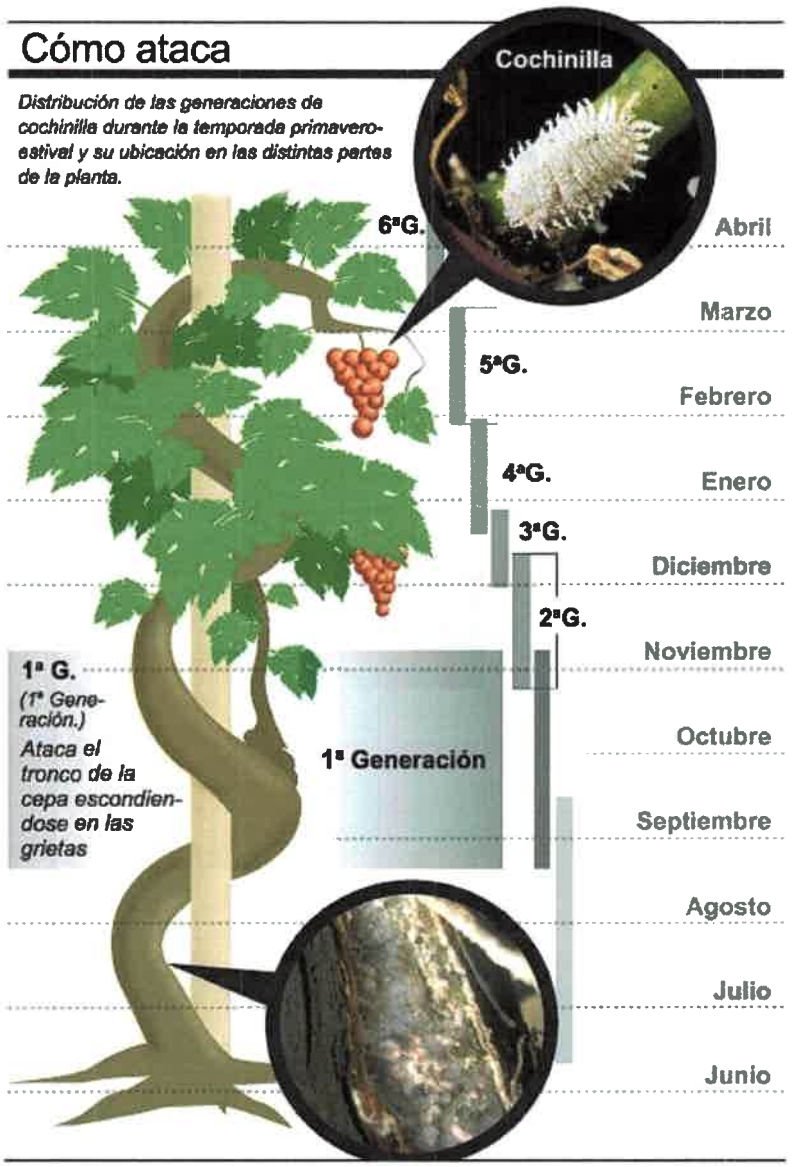


Figura 7. Ciclo de vida de *Planococcus ficus.*

La clave para reducir el riesgo de contaminación con ocratoxina A en los viñedos es el desarrollo de estrategias de manejo integrado para reducir la incidencia de las especies

de *Aspergillus* sección *Nigri*, en particular de *A. carbonarius*. Esto se podría lograr mediante: - el control de los daños en las bayas por hongos patógenos e insectos a través de la aplicación de fungicidas e insecticidas en aerosoles (Cozzi y col., 2006; Varga y Kozakiewicz, 2006), - el buen manejo de la canopia y la poda a fin de lograr que los racimos no queden expuestos a las quemaduras de sol, no se enreden y tengan una estructura menos compacta; - control del riesgo de los daños en las bayas en caso de precipitaciones antes de la cosecha (Leong y col., 2004).

7. Herramientas moleculares para la identificación de las especies fúngicas.

La identificación fúngica a nivel de especie es importante desde el punto de vista de la calidad e inocuidad alimentaria ya que permitiría una evaluación mejor del riesgo toxicológico en los alimentos. A tal fin han sido desarrolladas numerosas técnicas moleculares, mediante las cuales se puede lograr la identificación rápida y certera de las especies fúngicas contaminantes de los alimentos.

El desarrollo de la reacción de la polimerasa (PCR) en cadena permitió una serie de avances tecnológicos tanto en el diagnóstico basado en el ADN como en la tecnología del secuenciamiento del ADN. En particular, el secuenciamiento ha permitido elucidar la filogenia de muchos grupos taxonómicos particulares, incluido *Aspergillus* sección *Nigri,* y han facilitado el desarrollo de marcadores moleculares específicos de especies o de sus propiedades toxigénicas. Un marcador de ADN es típicamente una pequeña región de ADN que muestra polimorfismo de secuencia en individuos diferentes dentro de una misma especie. La principal ventaja del uso de marcadores moleculares es que se pueden detectar un número casi ilimitado de loci polimórficos en los individuos permitiendo una estimación directa de la variación genética en las poblaciones (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Las técnicas moleculares que se utilizan para discriminar taxones incluyen tanto las que se basan en polimorfismos del ADN ($RFLP_s$, $AFLP_s$, $RAPD_s$) como en la amplificación de los fragmentos de los genes codificantes de proteínas (calmodulina, β-tubulina, factor de elongación 1-alfa) y de las regiones genómicas no codificantes del ADNr (ITS e IGS). Variantes de la técnica de PCR permiten amplificar las secuencias de ADN copia (RT-PCR) y detectarlas en tiempo real permitiendo la estimación de la cantidad inicial de ADN (o ADNc) presente en las muestras (PCR cuantitativa o en tiempo real).

7.1 Marcadores moleculares basados en PCR.

7.1.1 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción es una de las primeras técnicas de diagnóstico descriptas basadas en PCR, y consiste en visualizar diferencias en la secuencia del ADN digerido con endonucleasas de restricción por hibridización con sondas de ADN ("Southern blotting") (Botstein y col., 1980). Dicha técnica se ha utilizado para analizar variaciones del ADN mitocondrial, variaciones del ADN ribosomal o variaciones en las secuencia repetidas o únicas (Liu y Furnier, 1993). Dependiendo de la región amplificada, su tamaño o nivel de variabilidad se aplica para la diferenciación de cepas o linajes a nivel intraespecífico, o entre especies o géneros. Diversos trabajos han demostrado la utilidad del análisis por RFLP para distinguir entre organismos estrechamente relacionados o inferir sus relaciones filogenéticas dentro del genero *Aspergillus*, tanto de la sección *Flavi* (Kumeda y Asao; 1996, Nikkuni y col., 1998), *Circumdati* (Varga y col., 2000) como de la sección *Nigri* (Accensi y col., 1999; Martinez-Culebras y Ramon, 2007).

7.1.2 Polimorfismo en el ADN amplificado al azar (RAPD).

En el ensayo de polimorfismo en el ADN amplificado al azar, los patrones de ADN son generados por la amplificación de segmentos de ADN al azar con cebadores cortos de secuencias de nucleótidos arbitrarias (Williams y col., 1990). La reacción de PCR se lleva a cabo a una temperatura de apareamiento baja, generando varios productos de PCR los cuales dan lugar a un patrón de bandas posterior a la separación por electroforesis en geles de agarosa. Se han desarrollado cebadores de PCR basados en las secuencia obtenidas a partir de fragmentos de RAPD para la detección de *Aspergillus carbonarius* y otras especies productoras de OTA de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Voetz y col., 2002; Fungaro y col., 2004). En otro estudio, un método de PCR múltiple permitió la detección de amplicones basados en los fragmentos de $RAPD_s$ para discriminar entre *A. ochraceus, A. carbonarius* y *A. niger*, simultáneamente (Sartori y col., 2006). Sin embargo, este método tiene limitaciones relacionadas con la reproducibilidad y la presencia de bandas inespecíficas resultantes de los productos de PCR. Por lo tanto, esta metodología no se recomienda para el estudio de las poblaciones fúngicas.

7.1.3 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados fue descripto por Vos y col. en 1995, y es un método que combina elementos de $RAPD_s$ y $RFLP_s$. La técnica se basa en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción generados a partir de ADN genómico. El ADN fúngico es digerido con endonucleasas de restricción, generalmente una enzima de corte raro y otra de corte frecuente, tales como *Eco*RI y *Mse*I, respectivamente. Los adaptadores de oligonucleótidos (generalmente de 18-20 pb) son ligados a los extremos del ADN genómico en los sitios de restricción específicos. La amplificación de dichos fragmentos se lleva a cabo utilizando cebadores que incluyan la secuencia de los adaptadores, parte de la secuencia del sitio de restricción y entre uno y cinco nucleótidos adicionales elegidos al azar. Uno de los cebadores se marca radiactivamente con [γ^{33}P] ATP, por lo tanto, serán visualizados sólo los fragmentos amplificados que lleven dicho marcador. El uso de extensiones selectivas tiene la función de reducir el número de fragmentos amplificados. Dichos fragmentos son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y detectados por autorradiografía (Figura 8).

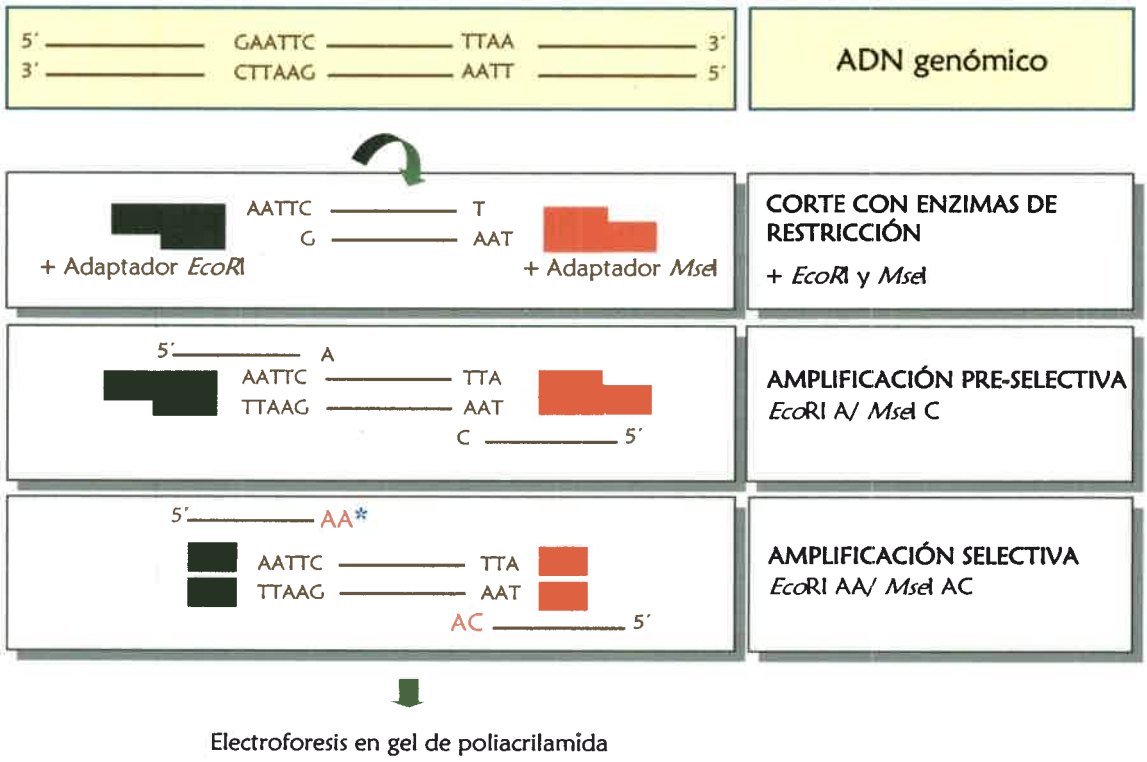


Figura 8. Esquema de la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción generados a partir de ADN genómico.

Los marcadores generados por $AFLP_s$ son neutros, no sujetos a la selección natural y son generados desde un número grande de locus independientes a partir de distintas partes del genoma (Majer y col., 1996; Mueller y col., 1996). La reproducibilidad de los marcadores generados por $AFLP_s$, su alta resolución y eficacia y la posibilidad de analizar el genoma completo brinda una excelente herramienta para los estudios de taxonomía molecular y evaluar la diversidad de las poblaciones fúngicas a nivel de especies, cepas y biotipos (Vos y col., 1995; Zeller y col., 2003; Perrone y col., 2006a,b).

Los marcadores de AFLP presentan varias ventajas con respecto a otras técnicas moleculares: i) pueden ser generados para cualquier organismo sin previo conocimiento del genoma, ii) las amplificaciones se llevan a cabo en condiciones de alta selectividad, eliminando variaciones artificiales eventualmente presentes en $RAPD_s$, iii) se requiere una mínima cantidad de ADN y su pueden usar mezclas parcialmente degradadas, iv) este tipo de marcadores pueden ser generados a gran velocidad con una alta tasa de polimorfismo, v) los marcadores de AFLP segregan de manera mendeliana y vi) tienen una alta resolución (Vos y col., 1995; Mueller y Wolfenbarger, 1999).

7.2 Secuenciamiento.

7.2.1 Genes del ácido desoxiribonucleico ribosomal (ADNr).

Una de las regiones empleadas para la distinción entre especies fúngicas es el ADN ribosómal (ADNr). Los genes que codifican para el ADNr en eucariotas están repetidos en "tándem" con varios cientos de copias por genoma. Cada copia consiste en regiones altamente conservadas, que incluyen los genes que codifican para las subunidades de ADNr 18S, 5,8S y 28S (White y col., 1990), alternadas con regiones espaciadoras variables (ITS e IGS). Los espaciadores ITS (espaciadores internos transcriptos) consisten en dos regiones variables no codificantes llamadas ITS1 e ITS2, que están localizadas entre los genes del ADNr 18S y 5,8S y entre el 5,8S y 28S respectivamente. La región IGS (región espaciadora intergénica) separa las unidades 18S y 28S del ADNr y no se transcribe, mientras que las regiones ITS si lo hacen (Figura 9).

Las regiones más conservadas (genes) permiten la comparación de especies mas alejadas evolutivamente mientras que el estudio de las regiones variables (espaciadores) permite realizar estudios entre especies más cercanas. En *Aspergillus* sección *Nigri* se han realizado varios estudios filogenéticos para diferenciar especies estrechamente relacionadas mediante el uso de las regiones espaciadores IGS e ITS (González-Salgado y col., 2005; Martínez-Culebras y col., 2009).

Figura 9. Estructura genómica del ADN ribosomal (ADNr). Las cajas sombreadas marcan la secuencia codificante (exón) y las cajas con trama la zona intrónica.

7.2.2 Genes de proteínas.

En los últimos años se ha extendido el uso del análisis de múltiples genes para los estudios filogenéticos, incorporando principalmente el análisis de los genes codificantes de proteínas (Berbee y Taylor, 2001). Sin embargo, estos genes deben cumplir con una serie de requisitos para poder ser utilizados en filogenia, tales como no haber sufrido transferencia horizontal o duplicaciones génicas frecuentes. Los genes de β-tubulina, la calmodulina y el factor de elongación 1-α han demostrado ser eficaces para su uso con fines taxonómicos (O'Donnell y col., 1998; Couch y Kohn, 2002; Cruse y col., 2002) (Figura 10).

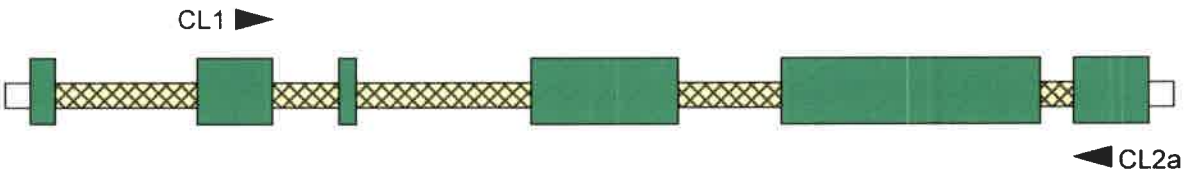
El gen de la β-tubulina es uno de los más utilizados en estudios filogenéticos. El gen codifica para las tubulinas, entre las cuales se incluyen la β, α, γ, δ, y ε-tubulinas. La β-tubulina, junto con la α-, forman los microtúbulos. O'Donnell y col. (1998) demostraron que el gen de la β-tubulina aporta 3.5 veces más información filogenética que el gen 18S del ADNr mitocondrial y lo propusieron como marcador para el estudio del género *Fusarium* Link. En *Aspergillus* sección *Nigri*, todas las especies aceptadas actualmente excepto *A. lacticoffeatus*, pudieron ser distinguidas en base a los datos obtenidos mediante la secuencia del gen de la β-tubulina (Samson y col., 2004; Varga y col., 2007).

La calmodulina es una proteína ligante de calcio que interviene en el metabolismo de los iones calcio en numerosos sistemas biológicos, incluyendo señales de transducción, motilidad, secreción y regulación del ciclo celular (Rasmussen y col., 1990; James y col., 1995). El gen que codifica para la calmodulina ha sido utilizado en numerosos estudios filogenéticos a nivel de especies y de taxones superiores debido a que su secuencia de aminoácidos es altamente conservada (Takagi y col., 1980; Nikoh y col., 1994; O'Donnell y col., 2000; Couch y Kohn, 2002; Susca y col., 2007a). En los últimos años, el estudio las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* mediante el uso de la secuencia del gen de la calmodulina ha permitido el desarrollo de cebadores específicos para su posterior aplicación en técnicas de detección rápida, tales como SSCP (polimorfismo de conformación de cadena sencilla de ADN), PCR en tiempo real y PCR-microarreglos (Perrone y col., 2004; Bufflier y col., 2007; Susca y col., 2007b).

El factor 1 de elongación peptídico es una proteína responsable del enlace de los aminoacil-ARN$_s$ de transferencia a los ribosomas eucarióticos. La subunidad alfa (EF-1α) se une al aminoacil-ARNt y los transfiere al ribosoma en un proceso vinculado a la hidrólisis del GTP. Las subunidades beta y delta participan en la conversión de GDP a GTP y la subunidad gamma es un componente estructural. El factor de elongación 1-α ha sido utilizado en varios estudios filogenéticos para clarificar los problemas taxonómicos relacionados con la identificación a nivel de especie (Knutsen y col., 2004; Kristensen y col., 2005).

La ARN polimerasa II es una de las tres enzimas en eucariotas que cataliza la transcripción del ADN a precursores de ARN mensajero, microARNs y otros tipos de ácido ribonucleico. En hongos, la enzima esta compuesta por varias subunidades proteicas y la región que codifica para la segunda subunidad proteica más grande (*rpb2*) es altamente conservada. Por lo tanto, la secuencia parcial del gen *rpb2* en combinación con el secuenciamiento de otros genes, se ha utilizado en varios estudios filogenéticos. Peterson (2008) obtuvo varios dendrogramas de las diferentes secciones del genero *Aspergillus* a partir de 4 secuencias genómicas diferentes: β-tubulina, calmodulina, ITS y genes del ADNr, y ARN polimerasa II. Además, realizó un árbol filogenético completo que describe las relaciones entre las secciones de la familia *Trichocomaceae*, basado en las secuencias génicas de la ARN polimerasa II, y los genes del ADN ribosómico 5,8S y 28S.

Calmodulina:



β-tubulina:

Factor de elongación 1-α:

Subunidad de la ARN polimerasa II:

Figura 10. Estructura genómica de los genes codificantes de proteínas y de los cebadores utilizados para el estudio filogenético. Las cajas sombreadas marcan la secuencia codificante de proteína (exón), y las cajas con trama la zona intrónica. (A) Estructura del gen de la calmodulina. Los cebadores CL1 y CL2a amplifican un fragmento de unos 536 pb. (B) Estructura del gen de la β-tubulina. Los cebadores Bt2a y Bt2b amplifican un fragmento de unos 430 pb. (C) Estructura del gen del factor de elongación 1α. Los cebadores E1 y E2 amplifican un fragmento de unos 694 pb. D) Estructura del gen de la subunidad de la ARN polimerasa II. Los cebadores 5F2 y 7CF amplificaron un fragmento de 1083 pb. .

7.3 Reacción de la polimerasa en cadena- reversa transcriptasa (PCR-RT).

La aplicación de la técnica de RT-PCR permite detectar la expresión de los genes mediante la amplificación por PCR de ADN_s copia, sintetizados por transcripción inversa a partir de los ARNms (Edwards y col., 2002). En varios estudios, la RT-PCR se ha utilizado para monitorizar la expresión de los genes en respuesta a diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico (Russell y Paterson 2006; Niessen, 2007) y, en la expresión de los genes involucrados en la producción de micotoxinas tales como aflatoxinas (Sweeney y col., 2000; Scherm y col., 2005; Degola y col., 2007), tricotecenos (Doohan y col., 1999), fumonisinas (Lopez-Errasquin y col., 2007; Jurado y col., 2008) y ocratoxina A (Gallo y col., 2009).

7.4 Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa (PCR cuantitativa).

Como se ha descripto previamente existen diversos métodos basados en PCR para la detección de las especies fúngicas, incluyendo las especies de *Aspergillus* productoras de OTA (Schmidt y col., 2003; Dao y col., 2005; Sartori y col., 2006). Sin embargo, la PCR convencional sólo permite la detección cualitativa mientras que, la técnica de PCR en tiempo real o cuantitativa permite evaluar la amplificación en cada ciclo de la PCR mediante el uso de sondas o moléculas fluorescentes y por lo tanto, se puede estimar la cantidad de DNA genómico inicial (Gizinger, 2002; Wilhelm y Pingoud, 2003; Russell y Paterson, 2006). Puede ser realizada tanto con ADN genómico como con ADNc (RT-PCR en tiempo real), permitiendo en este ultimo caso obtener valores precisos de expresión génica.

Mule y col. (2006) detectaron y cuantificaron por PCR en tiempo real cepas de *A. carbonarius* en uvas usando sondas basadas en el gen de la calmodulina. Posteriormente, el conocimiento de los genes implicados en la vía biosintética de la ocratoxina A permitió el desarrollo de una metodología específica para *A. carbonarius,* mediante el uso del gen de la policétido sintetasa (Atoui y col., 2007; Selma y col., 2008).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes descriptos se plantea la siguiente **hipótesis:**

- En las regiones vitivinícolas de Argentina el riesgo de contaminación con ocratoxina A en uvas y vinos está relacionada a la distribución de las especies ocratoxigénicas y a su interacción con las condiciones agroecológicas de las regiones.

A fin de demostrar la hipótesis planteada se cumplimentaron los siguientes objetivos.

Objetivo General:

-Determinar el potencial de contaminación con ocratoxina A en uvas cosechadas en distintas regiones vitivinícolas de Argentina (La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén - Río Negro).

Objetivos específicos:

- Determinar la distribución de especies potencialmente ocratoxigénicas en uvas en el estadio de cosecha en muestras recolectadas en distintas regiones vitivinícolas de Argentina (La Rioja, San Juan, Mendoza y Neuquén - Río Negro) durante 2 años de vendimia.

- Correlacionar la distribución de las especies con las características climáticas de las zonas.

- Determinar el perfil ocratoxigénico de las cepas.

- Evaluar la incidencia natural de ocratoxina A en uvas a cosecha y vinos.

- Determinar el efecto del daño en las uvas producido por *Planococcus ficus* sobre la contaminación con *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de ocratoxina A.

- Evaluar la diversidad de *Aspergillus* sección *Nigri* a través del uso de marcadores moleculares ($AFLP_s$).

- Confirmar la identificación de las especies mediante el secuenciamiento de los genes de la calmodulina, β-tubulina, el factor de elongación 1-α y la subunidad de la ARN polimerasa II.

MATERIALES Y METODOS

1. Muestreo.

Distribución de *Aspergillus* sección *Nigri* en las distintas regiones vitivinícolas de Argentina.

Los muestreos se realizaron en viñedos ubicados en 7 regiones vitivinícolas de Argentina, localizados en las provincias de La Rioja - Valle de Famatina (Chilecito), San Juan - Valle del Tulum, Mendoza Noreste, Mendoza - Valle de Uco, Zona Alta del Río Mendoza (ZARM), Mendoza Sur (San Rafael) y Río Negro - Neuquén. Un total de 50, 38, 35, 18 y 21 viñedos fueron evaluados durante las vendimias 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10 y 2010/11, respectivamente. Se evaluaron siete variedades de uvas codificadas por el Instituto Nacional de Vitivinicultura Res. C22/02, como *Merlot, Malbec, Cabernet Sauvignon, Syrah, Bonarda* y *Pinot Noir*. Las muestras fueron recolectadas en el estadio fisiológico de cosecha y se siguió un plan de muestreo previamente establecido en Europa (Kozakiewicz, comunicación personal). Se eligieron 10 plantas a lo largo de las dos diagonales en el viñedo (Figura 11). De cada planta, se recolectaron tres racimos de uvas de la posición central. Por lo tanto, 30 racimos fueron considerados como una muestra. Los racimos fueron recolectados en bolsas de papel y almacenados a 4°C hasta ser analizados dentro de las 24 hs.

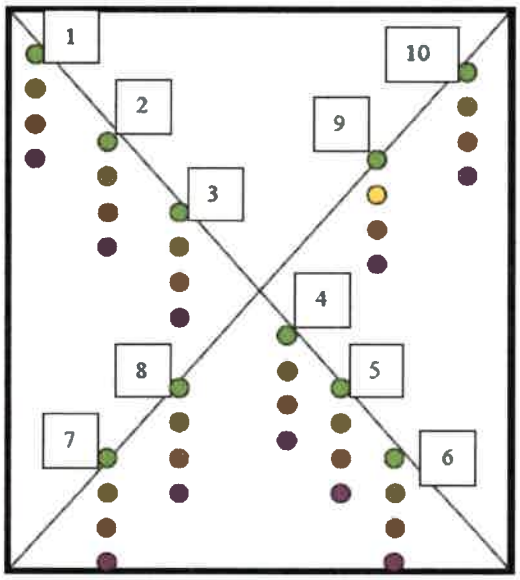


Figura 11. Esquema de muestreo en el viñedo.

1.1 Recolección de datos adicionales.

En las distintas zonas de muestreo se obtuvieron datos sobre la variedad de uva cultivada, las condiciones climáticas (ver Anexo Tablas y Figuras), la latitud, la longitud, la

altitud, el tipo de suelo, el sistema de conducción y el sistema de riego, a fin de correlacionar dicha información con la micoflora aislada (Tablas 5, 6, 7 y 8).

Tabla 5. Localización de las regiones vitivinícolas evaluadas.

Regiones vitivinícolas	Longitud O	Latitud S	Altitud (m)
La Rioja – Valle de Famatina	67º 38'	29º 14'	1081
San Juan- Valle del Tulum	68º 32´	31º 37´	618
Mendoza Noreste	68º 29'	33º 06'	653
Mendoza- Valle de Uco	69º 04'	33º 42'	940
Mendoza ZARM	68º 49'	33º 03'	924
Mendoza Sur	68º 05'	34º 35'	750
Río Negro - Neuquén	67º 40'	39º 01'	242

Tabla 6. Características de las variedades de uvas.

Variedad	Frutos	Racimo
Cabernet Sauvignon	Pequeños, esféricos, de piel espesa y dura, con profundo pigmento negro.	Alargado de pequeños granos esféricos de un negro azulado.
Malbec	Esféricos, pequeños o medianos, de color negro azulado, con piel delgada y pulpa blanda.	Medianos, a menudo alados y bastante sueltos.
Merlot	Cilíndricos, pequeños y oscuros	Medianos, sueltos y alargados
Syrah	Pequeñas, ovoides, de color azulado y piel es medianamente espesa.	Mediano, cónico alargado con tendencia a cilíndrico y compacto.
Bonarda	Negro-azulados, esferoides, con pulpa blanda.	Medianos, bien llenos.
Pinot Noir	Esféricas.	Pequeños, compactos, cilíndricos, a veces alados.

Tabla 7. Sistemas de conducción utilizados en Argentina.

Sistema de conducción	Características	
Parral	Su estructura básica queda definida a una altura de aproximadamente 2,10 m, por la disposición de alambres horizontalmente en dos ejes, entrecruzados formando una malla de 0,5 x 0,5 m	
Espaldero	Su estructura básica queda definida por la disposición vertical de alambres (normalmente 3).	**Espaldero bajo:** Presenta una altura total de 1,5 m. **Espaldero alto:** Presenta una altura de 1,8 m.

Tabla 8. Sistemas de riego en los viñedos.

Método de riego	Descripción y clasificación
Por gravedad	El agua se aplica cubriendo parcialmente el terreno y se escurre infiltrándose en los pequeños cauces llamados surcos (riego por surco) o bien se desliza sobre el suelo en lámina que se infiltra en su desplazamiento (riego por inundación o melgas).
Presurizados	El agua se aplica asperjada, como si fuera una lluvia (aspersión) o mediante emisores (goteo).
Subterráneos	El agua asciende por capilaridad desde un nivel freático provocado artificialmente en la base de la capa de raíces.

Efecto de *Planococcus ficus* sobre la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de ocratoxina A en uvas.

Los muestreos se realizaron en viñedos localizados en el departamento de Lujan de Cuyo (altitud 924,50 m. sobre el nivel del mar, longitud 68°52' O, latitud 33°1' S), una de las principales áreas vitivinícola de la provincia de Mendoza. Se analizaron tres variedades de uvas (Malbec, Merlot y Cabernet Sauvignon) recolectadas durante el estadio de cosecha y dos categorías de uvas fueron evaluadas: uvas dañadas por *P. ficus* y uvas intactas. El ensayo se llevó a cabo durante las vendimias 2006/07 y 2008/09, y se siguió la metodología de muestreo detallada previamente en III-1.

2. Análisis de la micoflora y *Aspergillus* sección *Nigri* en las uvas.

2.1. Recuento, aislamiento e identificación de la micoflora contaminante.

El porcentaje de las bayas infectadas con hongos se determinó por el método de siembra directa. De cada muestra se tomaron 50 bayas de uvas al azar, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Luego se realizaron tres lavados sucesivos en agua destilada estéril. Las uvas desinfectadas superficialmente fueron cortadas a la mitad y colocadas sobre la superficie de los medios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) y agar dicloran - glicerol al 18% (DG18). Las placas se incubaron durante 7 días a 28°C. Se calcularon los porcentajes de infección a través de la siguiente relación: n° uvas infectadas/n° uvas totales colocadas en las placas de Petri. Las cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas, se subcultivaron en el medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) para su posterior identificación a nivel de especie.

Las colonias fúngicas desarrolladas se observaron macroscópica y microscópicamente y se identificaron a nivel de género de acuerdo a las claves taxonómicas de Pitt y Hocking (1997) y Samson y col. (2000).

2.2 Identificación de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*.

Para la identificación de las especies del género *Aspergillus* sección *Nigri*, se siguió la metodología descripta por Pitt y Hocking (1997), Klich (2002). Se utilizaron los medios de cultivo: agar extracto de malta (MEA), agar Czapek-extracto de levadura (CYA), agar nitrato glicerol al 25% (G25N) y agar Czapek extracto de levadura sacarosa (CY20S). Cada cepa se inoculó en los medios de cultivo en tres puntos equidistantes entre sí, en relación con el borde y el centro de la placa. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 28 y 37 ± 1°C según correspondió, siguiendo el esquema de inoculación e incubación que se muestra en la Figura 12.

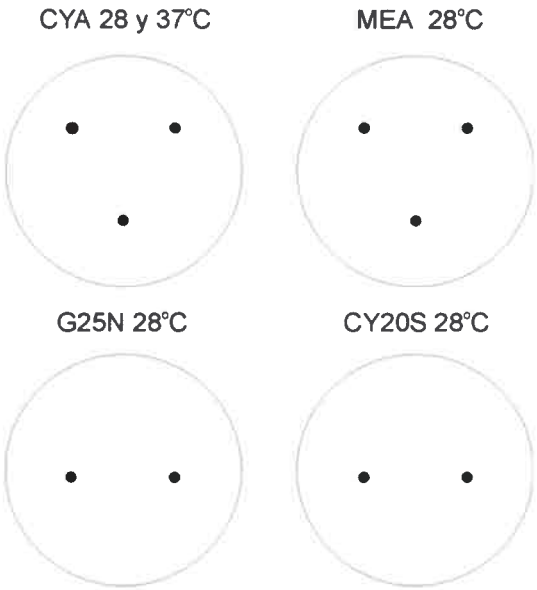


Figura 12. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos.

Las características microscópicas más relevantes que se tuvieron en cuenta para la diferenciación de las especies de la sección *Nigri* fueron longitud del conidióforo, presencia de una o dos hileras de fiálides, diámetro y forma de la cabeza aspergilar, tamaño, forma y ornamentación de los conidios.

Las cepas identificadas dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* fueron incluidas en tres grupos: agregado *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus* uniseriados. *A. carbonarius* se identificó microscopicamente por el tamaño y forma de sus conidios. Todos los demás aspergilos negros biseriados fueron identificados como pertenecientes al agregado *A. niger*. Las especies que presentaban conidióforo uniseriado se agruparon como *Aspergillus* uniseriados

2.2.1 Cálculo del índice de biodiversidad de Shannon-Wiener.

El índice de Shannon Wiener se usa para medir biodiversidad y toma en cuenta la cantidad de especies presentes en una zona determinada (*riqueza de especies*), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (*abundancia*). Este índice se representa como *H* y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0 y 1. La fórmula del índice de Shannon es la siguiente:

$$H = - \sum (p_i \log [p_i]),$$

donde:

- p_i - proporción de individuos de la especie *i* respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie: n_i / N.
- n_i - número de individuos de la especie *i*.
- *N* - número de todos los individuos de todas las especies.

3. Perfil ocratoxigénico de las cepas de *Aspergillus* de la sección *Nigri* aisladas.

3.1 Especies fúngicas.

Se evaluaron 562 cepas aisladas de uvas, que incluían 466 cepas pertenecientes al agregado *A. niger,* 49 cepas de *A. carbonarius* y 47 cepas de *Aspergillus* uniseriados.

3.2 Capacidad toxigénica.

Para determinar la capacidad de producir OTA se siguió la metodología descripta por Bragulat y col. (2001). Las cepas se inocularon en el medio de cultivo agar Czapek-extracto de levadura (CYA), a 25°C durante 7 días en oscuridad. La extracción de la toxina se realizó con metanol (1 mL) a partir de tres discos de agar (3 mm) tomados del cultivo desarrollado en medio CYA. Cada extracto fue centrifugado a 11.000 rpm durante 20 min. y la fase metanólica fue filtrada a través de un filtro de membrana de nylon (0.45 µm). Una vez evaporado a sequedad con N_2, el extracto seco fue conservado a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC.

Las cepas identificadas como *A. carbonarius* que no produjeron niveles detectables de OTA en medio CYA, fueron nuevamente analizadas utilizando diferentes medios de cultivo. Para ello, las cepas se inocularon por triplicado en los medios de cultivo líquidos: extracto de levadura-sacarosa (YES) y caldo papa-glucosado (PDB) y se incubaron a 25°C

durante 10 días en oscuridad. Finalizado el período de incubación los cultivos se filtraron a través de papel de filtro (Whatman N°1). La extracción de la OTA se realizó mezclando 1 mL de cultivo con 900 µL de la fase móvil. El extracto se filtró nuevamente a través de un filtro de membrana de nylon (0.45 µm) previo al análisis por HPLC.

3.3 Detección y cuantificación.

La detección y cuantificación de la toxina a partir de los extractos secos se realizó utilizando un sistema de detección con fluorescencia por cromatografía de alta performance (HPLC), en cromatógrafo Hewlett Packard Serie 1100. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Phenomenex, Luna), conectada a una pre-columna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). El loop utilizado fue de 50 µL. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo: agua: ácido acético (99:99:2). El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min. La longitud de onda de excitación y emisión utolizada fue 330 y 460 nm, respectivamente. Las soluciones testigos se prepararon disolviendo OTA pura (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%) en metanol. Se resuspendieron los extractos en 250 µL de metanol. La cuantificación de OTA se realizó por la medición de la altura de los picos y su extrapolación a una curva de calibración obtenida mediante el uso de soluciones testigos de OTA.

4. Incidencia natural de ocratoxina A en muestras de uva.

4.1 Análisis de ocratoxina A en las uvas.

La extracción de OTA a partir de las muestras de uvas se realizó según la metodología descripta por Visconti y col. (2001), con algunas modificaciones. Se molieron 50 gr de uvas y se mezclaron con 150 mL de una solución de $NaHCO_3$ al 5%, PEG 8000 al 1% en agua. La mezcla fue homogeneizada durante 30 minutos y filtrada a través de filtros de microfibra de vidrio (Whatman, 0,45 µm). Luego se centrifugó el extracto a 2650 rpm durante 15 min a 4° C y nuevamente se filtró (filtros de membrana de vidrio). Diez mL del extracto obtenido se pasó a través de una columna de inmunoafinidad (Ochratest, VICAM). La columna fue posteriormente lavada con 5 ml de una solución de ClNa 2,5%, $NaHCO_3$ 0,5% en agua y luego con 5 mL de H_2O destilada. La toxina fue eluída con 2 mL de Me (OH) y el extracto evaporado a sequedad con N_2. El extracto seco se conservó a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC.

4.2 Ensayo de recuperación de ocratoxina A.

Los experimentos de recuperación se realizaron adicionando una solución testigo de OTA en metanol a muestras de uvas libres de toxina, para obtener concentraciones finales de 0,2, 0,8, 1,5 y 3,0 ng de OTA/gr de muestra. Se incluyó un blanco libre de toxina. La extracción de OTA se realizó de acuerdo a la metodología mencionada previamente en el ítem 4.1. El nivel medio de recuperación fue de 84,25 ± 2%. El límite de detección de la técnica fue de 0,01 ng/gr y el límite de cuantificación de 0,1 ng/gr.

5. Incidencia natural de ocratoxina A en muestras de vino.

5.1 Extracción de ocratoxina A en muestras de vinos.

El contenido de OTA fue determinado siguiendo la metodología propuesta por Visconti y col. (2001). Se tomaron 10 mL de vino y se mezclaron con 10 mL de solución al 1% de PEG 8000 y 5% de $NaHCO_3$. Posteriormente se filtró el extracto, y se tomó una fracción de 10 ml del filtrado y se pasó a través de una columna de inmunoafinidad. La columna se lavó con 5 mL de solución de lavado que contenía 2,5% NaCl y 0,5% $NaHCO_3$ y posteriormente con 5 mL de H_2O destilada. La ocratoxina A fue eluída finalmente con 2 mL de metanol (grado HPLC), el extracto fue llevado a sequedad con N_2 y almacenado a 4°C hasta su análisis por HPLC.

6. Análisis estadístico de los datos.

Los datos de contaminación fúngica y ocratoxina A se analizaron por medio del test de ANOVA y la separación de las medias por el test de Tukey ($p<0,001$, $p<0,05$). Los análisis de regresión se realizaron utilizando el coeficiente de Pearson. Para todos los estudios estadísticos se utilizó el programa de SigmaStat para Windows versión 3.5 (SPSS, Chicago, USA).

Para determinar si las variables climáticas de cada zona vitivinícola (temperatura, humedad relativa, precipitaciones) influenciaban sobre los porcentajes de infección de las diferentes especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas y los niveles de OTA producidos, se realizó un análisis multivariado de componentes principales utilizando el programa InfoStat versión 1.0 (Argentina). Los datos composicionales (%) se transformaron utilizando la transformación de Atkinson:

I = log (proporción de cepas de una especie determinada + 0,01)/ (proporcion de cepas de otra especie determinada + 0,01)

La interpretación del análisis multivariado se realizó a partir de un gráfico biplot (Gabriel, 1971) y los resultados se confirmaron, a través de un análisis de correlaciones canónicas. Dicho análisis provee una medida de correlación entre una combinación lineal de las variables en un conjunto (variables: índice agregado *A. niger/A. carbonarius,* índice *A. carbonarius/*agragado *A. niger*, índice *A.* uniseriados/agragdo *A. niger*, OTA producida por el agregado *A. niger* y OTA producida por *A. carbonarius*) con una combinación de las variables en otro conjunto (variables climáticas: temperatura, humedad relativa y precipitaciones) (Hotelling, 1936).

7. Caracterización de las especies del género *Aspergillus* sección *Nigri* mediante el uso de marcadores moleculares generados mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados ($AFLP_s$).

7.1 Cepas.

Se seleccionaron al azar 88 cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Negri* obtenidas de diferentes zonas vitivinícolas de Argentina para su identificación a nivel de especie mediante el uso de marcadores moleculares ($AFLP_s$). Se incluyeron en el análisis las cepas de referencia *Aspergillus niger* FRR 5722, FRR 5695, ITEM 4501, *Aspergillus awamori* FRR 5804, ITEM 4502, ITEM 4509, *Aspergillus tubingensis* FRR 5720, *Aspergillus carbonarius* FRR 5690, *Aspergillus lacticoffeatus* ITEM 7559, *Aspergillus sclerotiicarbonarius* ITEM 7560, *Aspergillus homomorphus* ITEM 7556, *Aspergillus ibericus* ITEM 4776, *Aspergillus japonicus* ITEM 7034 y *Aspergillus aculeatus* ITEM 7046.

7.2 Producción de la biomasa fúngica.

A partir de cada cepa desarrollada en agar extracto de malta (MEA) durante 7 días a 28°C, se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido y se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio Wickerham. Las cepas se incubaron a 26°C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm). El micelio se cosechó por filtración, se lavó con agua destilada estéril y se secó entre papel absorbente. Las muestras se almacenaron a - 20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

7.3 Extracción y purificación del ADN genómico.

El micelio congelado se pulverizó en morteros con nitrógeno líquido para lograr la ruptura mecánica de las células. Para extraer el ADN, se utilizó el buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Murray y Tompson (1980), modificada por Kérenyi y col. (1999). Al micelio congelado (aproximadamente 1,5 a 2 gr) se le adicionó 700 µL de buffer CTAB al 2% (65°C) (2% CTAB, 100 mM Tris-ClH [pH 8], 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) y 15 µL de 2-mercaptoetanol y se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se agregó 300-400 µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 2 a 3 min. en agitador Vortex y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Se tomó 600 µL de la fase acuosa y los ácidos nucleicos crudos se precipitaron con un volumen igual de iso-propanol. El "pellet" se disolvió en 350 µL de buffer TE 1x (10 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA) y se agregó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol iso-amílico (25:24:1, v/v/v) y se centrifugó la mezcla a 12.000 rpm durante 5 min. La fase acuosa (aproximadamente 500 µL) se trató con 1,5 µL de ARNsa A (2 mg/mL) e incubó a 37°C durante 30 min. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 500 µL de isopropanol. El pellet se lavó 2 ó 3 veces con 1 mL de etanol frío al 70% (v/v), se secó a temperatura ambiente durante 2 ó 3 min. y se resuspendió en 50 µL de buffer TE 1x para ser conservado hasta su posterior análisis.

El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con Hind/// como ADN testigo. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1x (40 mM Tris-base [pH 8], 0,5 mM EDTA; ácido acético glacial) a 60 Volt conteniendo bromuro de etidio (5 µg/mL). Se realizaron las diluciones correspondientes de cada muestra en agua bidestilada calidad biología molecular hasta obtener concentraciones de 100 ng para su posterior análisis.

7.4 Generación de los marcadores de AFLP$_s$

Los marcadores de AFLPs se generaron siguiendo la metodología propuesta por Vos y col. (1995), modificada por Zéller y col. (2000). El ADN genómico (aproximadamente 100 ng) de cada una de las muestras analizadas se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con la mezcla de reacción digestión-ligación. La reacción de pre-amplificación del ADN digerido y ligado se realizó diluyendo con 9 volúmenes de buffer TE 1x. Un volumen de 2,5 µL de la mezcla diluida se utilizó en la mezcla de pre-amplificación. Las muestras se amplificaron en un termociclador MJ Research 200.

El ADN pre-amplificado se diluyó con 49 volúmenes de buffer TE 1x y se utilizó como ADN templado en la reacción de amplificación. En las reacciones para la obtención de AFLP se usaron dos cebadores de oligonucleótidos: *Eco*RI y *Mse*I. El primero se marcó

radioactivamente con [γ^{33}P] ATP y T4 polinucleótido quinasa y se incubó durante 1h a 37°C y 15 min. a 70°C. Dicho cebador marcado fue agregado a la mezcla de reacción de amplificación.

Los productos de amplificación se diluyeron en un volumen igual de formamida, se desnaturalizaron a 90°C durante 3 min. y se enfriaron rápidamente en hielo molido antes de la siembra. Previamente se polimerizó el gel de poliacrilamida al 6% (Long Ranger, FMC, Rockland, ME, USA) y se colocó en el equipo de electroforesis vertical (Figura 13).

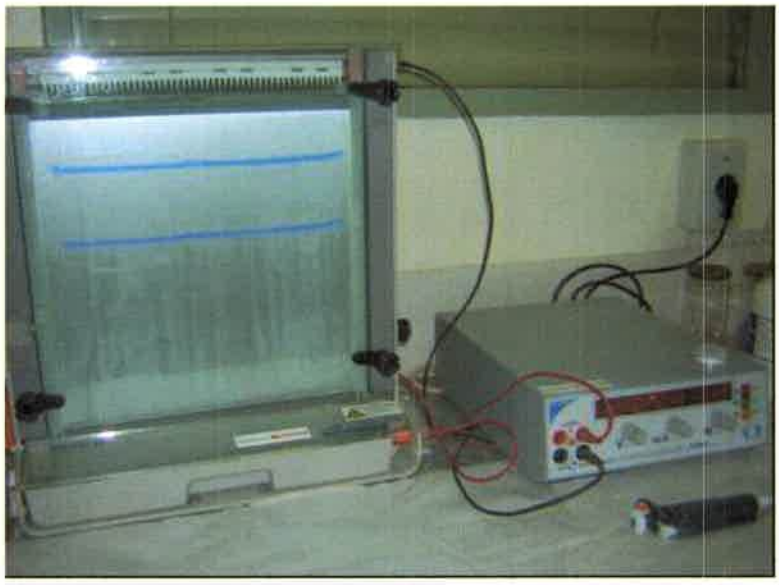


Figura 13. Desarrollo de los marcadores moleculares por AFLP. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida polimerizado se acondicionó por calentamiento a 60°C y se sembraron las muestras de ADN amplificado (3,7 µL) junto a un marcador de peso molecular. Se realizó la corrida electroforética utilizando buffer TBE 1x (40 mM Tris-base [pH 8], 0,5 mM EDTA; ácido bórico) a 60 Volt durante aproximadamente 2 hs. Una vez corrido el gel, se transfirió a papel de filtro y se secó al vacío durante 2 hs. a 80°C. Luego, el gel se transfirió nuevamente a una placa de autorradiografía (Classic Blue Sensitive, Molecular Technologies, St. Louis, MO, USA) y se mantuvo durante 3 a 4 días a temperatura ambiente en oscuridad, previo al revelado para identificar las bandas amplificadas.

Para el revelado, la placa de autorradiografía se colocó en soportes de acero inoxidable, se sumergió en el líquido fijador durante 4 min., se lavó con agua bidestilada y se sumergió en el líquido revelador durante 4 min. Se enjuagó con agua corriente y se secó a temperatura ambiente.

Mezcla de digestión – ligación

Volumen final: 20 µL

Componente	1 reacción
Enzima *Eco*RI (10 U/µL)	0,2 µL
Enzima *Mse*I (4 U/ µL)	0,4 µL
Buffer OPA 10x	2,0 µL
ADN molde (100 ng)	6,0 µL
Cebador *Eco*RI adaptador (5 pM stock)	0,4 µL
Cebador *Mse*I adaptador (5 pM stock)	0,4 µL
T-4 ADN ligasa	0,2 µL
Buffer T-4 ADN ligasa 10x	2,0 µL
H_2O bidestilada	8,4 µL

Reacción de pre-amplificación

Volumen final: 25,5 µL

Componente	1 reacción
Mezcla de digestión – ligación diluida	2,5 µL
100 mM de dNTPs (25 mM de c/u, A,C,G,T)	0,21 µL
Cebador de pre-amplificación *Eco*RI	0,65 µL
Cebador de pre-amplificación *Mse*I	0,65 µL
Buffer AFLP 10x	2,55 µL
Taq polimerasa (~7 U/ µL)	0,07 µL
H_2O bidestilada	18,87 µL

Reacción de amplificación

Volumen total: 5 µL

Componente	1 reacción
ADN molde	1,3 µL
Buffer AFLP 10x	0,5 µL
Cebador *Mse*I-XX + dNTP	1,125 µL
Cebador *Eco*RI-XX marcado con P^{33}	0,125 µL
Taq polimerasa (~7 U/ µL)	0,025 µL
H_2O bidestilada	1,925 µL

Condiciones de PCR:

Reacción de pre- amplificación:

Desnaturalización inicial: 94°C por 60 seg.

Amplificación (20 ciclos): 94°C por 30 seg. - 56°C por 60 seg. - 72°C por 60 seg.

Extensión final: 72°C por 5 min.

Final: 4°C indefinidamente.

Reacción de pre- amplificación:

Desnaturalización inicial: 94°C por 60 seg.

Primera amplificación (12 ciclos): 94°C por 30 seg. - 65°C por 30 seg. - 72°C por 60 seg. Durante los 12 ciclos la temperatura se reduce 0,7°C desde 65°C hasta alcanzar 56°C.

Segunda amplificación (22 ciclos): 94°C por 30 seg. - 56°C por 30 seg. - 72°C por 60 seg.

Extensión final: 72°C por 5 min.

Final: 4°C indefinidamente.

7.5 Análisis de los datos.

Para analizar los perfiles de $AFLP_s$, se determinó la presencia o ausencia de bandas para cada una de las cepas ensayadas por evaluación visual. Las bandas del mismo tamaño molecular en las diferentes cepas se consideraron como representadas por el mismo alelo y cada banda se trató como un único locus independiente con dos alelos. Cada fragmento amplificado fue considerado como un carácter, y cada uno de ellos tuvo dos posibles estados: presencia (1) o ausencia (0). Así se construyó una matriz binaria para grupo de cepas y el grado de similitud genética fue estimado con el programa SinQual (NTSYS.pc versión 2.01, F. J. Rohlp, Exeter Software, NY; Rohlf, 1990), teniendo en cuenta todos los pares de las cepas ensayadas de acuerdo al coeficiente Dice (S_d):

$$S_d = 2\, N_{xy} / (N_x + N_y)$$

donde, N_x y N_y representan los números de fragmentos amplificados en la cepa X e Y, respectivamente y, N_{xy} representa el número de fragmentos amplificados compartidos por ambas cepas (Dice, 1945). La distancia genética (D) se derivó del coeficiente de similitud de la siguiente manera: $D = 1 - S$.

El dendrograma de similitud genética fue construido usando el método de medias aritméticas UPGMA con el programa SAHN del NTSYS 2.0 (Numerical Taxonomy System; Applied Biostatistics Inc., New York, USA) (Rohlf, 1990). El dendograma con la mejor topología fue elegido basándose en el valor cofenético del MXCOMP, un programa de comparación de matrices del NTSYS. Los cálculos de similitudes genéticas fueron obtenidos usando el programa SAS, versión 6.11 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Los valores de bootstrap de los dendogramas se obtuvieron con el programa PAUP, versión 4.0 (Swofford, 1999).

8. Caracterización de las especies del género *Aspergillus* sección *Nigri* mediante el secuenciamiento de los genes de la calmodulina, la β-tubulina, el factor de elongación 1α y la subunidad de la ARN polimerasa II.

8.1 Cepas.

Se seleccionaron 99 cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri* obtenidas de diferentes zonas vitivinícolas de Argentina para el secuenciamiento de los genes de la calmodulina (*caM*), la β- tubulina (*benA*), el factor de elongación 1α (*ef-1α*) y la subunidad de la ARN polimerasa II (*rpb2*).

Se incluyeron en el análisis las cepas de referencia *Aspergillus carbonarius* ITEM 4503, *Aspergillus niger* ITEM 4509 e ITEM 4502, *Aspergillus tubingensis* ITEM 7040, *Aspergillus foetidus* ITEM 4507, *Aspergillus costaricaensis* ITEM 7555, *Aspergillus vadensis* ITEM 7561, *Aspergillus brasiliensis* ITEM 7048, *Aspergillus lacticofeatus* ITEM 7557, *Aspergillus ibericus* ITEM 4776, *Aspergillus sclerotioniger* ITEM 7560, *Aspergillus homomorphus* ITEM 7556, *Aspergillus uvarum* ITEM 4834, *Aspergillus aculeatus* ITEM 7046 y *Aspergillus japonicus* ITEM 7034.

8.2 Producción de la biomasa fúngica.

La obtención de la biomasa fúngica se realizó mediante la metodología descripta previamente en el punto 1.2. El micelio obtenido fue liofilizado y almacenado a - 20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

8.3 Extracción y purificación del ADN genómico.

Para la obtención del ADN se siguió el protocolo de extracción de acuerdo a la descripción del proveedor utilizando el Kit comercial Wizard Magnetic DNA Purification

(Promega), con algunas modificaciones. Se pesó 10-15 mg de micelio liofilizado y se adicionó 250 µL de Buffer A y 2,5 µL de ARNsa A. La mezcla se pulverizó mediante la agitación con un homogeneizador (MixerMill) durante 0,30 min. a una frecuencia de 17 seg^{-1}. El extracto obtenido se incubó a 40°C durante 10 min. Luego se adicionó 125 µL de Buffer B y se agitó durante 0,30 min. a 12 seg^{-1} de frecuencia. Nuevamente se realizó una incubación a 40°C durante 10 min. Posteriormente, se agregó 375 µL de solución precipitante y se agitó durante 0,30 min. a 0,8 seg^{-1}. El extracto obtenido se centrifugó durante 10 min. a 13.000 rpm y 500 µL del sobrenadante se transfirió a una policubeta de 96 pocillos. La policubeta se introdujo en un sistema de robotizado epMotion 5075 TMX (Eppendorf), y la mezcla de reacción contenía 25 µL de la solución Magnesil® Paramagnetic Particles, 400 µL de isopropanol, 150 µL de buffer B, 750 µL de etanol 70% y 120 µL de agua destilada estéril, éste último paso se repitió dos veces consecutivas.

La calidad del ADN genómico se determinó por comparación visual utilizando el marcador molecular O'GeneRuler™ 100 pb, 1 µg/µL (Fermentas®) y el ADN se tiñó con GelStar® (Nucleic Acid Gel Satín). Las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1x a 70 Volt. La cuantificación del ADN de cada cepa se realizó mediante espectrofotometría (Spectophotometer ND-1000, Nano Drop).

8.4 Generación de las secuencias.

El secuenciamiento de los genes se realizó mediante el método enzimático de terminación de cadena de Sanger (1977). Para la amplificación parcial de los genes de la *benA*, la *caM*, el *ef-1α* y *rpb2* se utilizaron los cebadores Bt2a/Bt2b, CL1/CL2a, E1/E2 y A-EF_F/A-EF_R, respectivamente (Glass y Donaldson, 1995; O'Donnell y col., 2000).

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems 9700) y la mezcla de reacción para cada par de cebadores, consistió en un cebador direccionado en "forward" y otro cebador direccionado en "reverse". Después de la amplificación, los productos de PCR fueron purificados con la mezcla enzimática EXO/SAP (Exonuclease I, *E. coli* / Shrimp Alkaline Phosphatase).

Para la amplificación de Sanger, se utilizó el Kit de reacción Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) listo para ambas cadenas de ADN. Todas las reacciones de secuenciamiento se purificaron por cromatografía de filtración con Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada en agua bidestilada y se analizaron en un secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) y las secuencias se alinearon utilizando el software Navigator TM (Applied Byosistems).

Secuencia de los cebadores utilizados

Genes	Cebadores	Secuencia 5´- 3´	TH* (°C)
benA	Bt2a	5´- GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC - 3´	60
	Bt2b	5´- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC - 3´	
CaM	CL1	5´- GARTWCAAGGAGGCCTTCTC - 3´	57
	CL2a	5´- TTTTGCATCATGAGTTGGAC - 3´	
ef-1α	E1	5'-CCTTCAAGTACGCYTGGGTTC-3'	59
	E2	5'-TTCTTGGAGTCACCGGCAA-3'	
rpb2	5f2	5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3'	60,5
	7cf	5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3'	

* TH=Temperatura de hibridación utilizada en los ciclos de amplificación.

Reacción de amplificación

Volumen final: 10 µl

Componente	1 reacción
ADN molde	3 µL
Cebador "forward" 10 µM	0,3 µL
Cebador "reverse" 10 µM	0,3 µL
Hot Master *Taq* ADN polimerasa 1000U (5/PRIME)	0,05 µL
Buffer *Taq* con Magnesio 10x	1 µL
100 mM de dNTPs (25 mM de c/u, A,C,G,T)	0,2 µL
H_2O bidestilada	5,15 µL

Reacción de amplificación de Sanger

Volumen final: 5 µl

Componente	1 reacción
ADN molde	3 µL
Cebador (10 µM)*	0,08 µL
Mezcla de reacción lista Big Dye® Terminator	0,5 µL
H_2O bidestilada	1,42 µLl

* Reacción para un único cebador, ya sea "forward" o "reverse".

Condiciones de PCR:

Reacción de amplificación:

Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min.

Amplificación (35 ciclos): desnaturalización a 94 °C por 50 seg., alineamiento a 57 °C, 60°C, 59°C y 60,5°C durante 50 seg. para el gen de la caM, la βt, el EF-1α y la RPB2, respectivamente, extensión: 72°C por 1 min.

Extención final: 72°C por 7 min.

Enfriamiento: 4°C indefinidamente.

Reacción de amplificación de Sanger:

Desnaturalización inicial: 96°C for 10 seg.

Amplificación (35 ciclos): alineamiento a 50°C por 5 seg., extensión: 60°C for 4 min.

Enfriamiento: 4°C indefinidamente.

8.5 Alineamiento de secuencias nucleotídicas.

Las secuencias de los genes se alinearon utilizando el programa informático Bionumerics versión 6.0 - Applied Maths (Meth Lab, Belgium) y, en caso de ser necesario se realizaron algunos ajustes manuales.

8.6 Análisis filogénico.

Los árboles filogeneticos se construyeron mediante el método de distancias del Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol consenso se obtuvo con la suma de longitud de la rama = 0.65785068. El árbol se graficó a escala, con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Tamura-Nei (1993) y se expresan en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Las posiciones del codón incluidos fueron 1st+2nd+3rd+no codificantes. Todas las posiciones que contenían ausencia o error en la lectura de la secuencia de los nucleótidos fueron eliminados del conjunto de datos. Se consideraron un total de 788 posiciones en el conjunto de datos finales analizados.

El análisis filogenético se realizó a partir de las secuencias alineadas utilizando el programa informático MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007) y se consideró un bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) para corroborar la certeza estadística de las diferentes ramas generadas.

9. Perfil toxigénico de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis molecular

9.1 Análisis de la producción de ocratoxina A.

9.1.1 Capacidad toxigénica.

Para determinar la capacidad de producir OTA por las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* se siguió la metodología desarrollada por Bragulat y col. (2001), descripta previamente en el ítem 3.

9.2 Análisis de la producción de fumonisinas.

9.2.1 Capacidad toxigénica.

Para determinar la capacidad de producir fumonisinas por las cepas de *Aspergillus niger* se siguió la metodología propuesta por Frisvad y col. (2007), con algunas modificaciones. Las cepas se inocularon en medio de cultivo agar Czapek-extracto de levadura con sacarosa al 20% (CY20S), a 25°C durante 7 días en oscuridad. La extracción de las toxinas se realizó con 750 µL de metanol:agua (70:30, v/v) a partir de cinco discos de agar (6 mm) extraidos del cultivo desarrollado en medio CY20S. La toxina fue extraída por ultrasonido durante 50 min. y luego filtrada a través de un filtro RC de 0,2 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). El extracto fue evaporado a sequedad en una centrífuga evaporadora (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA), y conservado a 4°C hasta el momento del análisis por LC/MS/MS.

9.2.2 Detección y cuantificación de FB_2 y FB_4.

La detección y cuantificación de la toxina a partir de los extractos secos se realizó utilizando un sistema de detección por cromatografía de alta performance (HPLC) equipado con dos microbombas Serie 200 (Perkin Elmer, Ontario, Canadá). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C_{18} (150 x 2 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Phenomenex). Como fase móvil se utilizó: A, una mezcla de agua:ácido fórmico (0,1%) y B, una mezcla de acetonitrilo:metanol (80:20, v/v): ácido fórmico (0,1%). El gradiente utilizado fue: 30% a 100% de la mezcla A durante 8 min., 100% de la mezcla A durante 3 min., y 100% a 30% de la mezcla B durante 3 min. El volumen de inyección fue de 20 µL y el flujo de la fase móvil fue de 0,2 mL/min. Los análisis MS/MS se

realizaron en un espectrómetro de masa API 3000 triple quadrupole (Applied Biosystems, Ontario, Canadá) equipado con una fuente de turbo-ion-spray. Los siguientes parámetros de masa fueron utilizados: voltaje capilar (IS), 5000 V; potencial declustering (DP), 70 V; potencial de focalización, 340 V; y energía de colisión (CE), 51 V y 42 V para los iones hijos 336,2 y 512,2 m/z, respectivamente. Estos parámetros fueron optimizados con una infusión directa del compuesto puro (10 µg/mL) a un flujo contante de 6 µL/min, usando una bomba modelo 11 (Havard Apparatus, Holliston, MA, USA) dentro de la fuente del espectrómetro de masa. El gas (aire) se calienta a 350°C y el voltaje capilar se establece en +5000 V. Con el objeto de conseguir una máxima sensibilidad de detección, se realizaron los análisis en modo MRM (*multiple reaction monitoring*).

RESULTADOS Y DISCUSION

SECCIÓN I

Distribución de *Aspergillus* sección *Nigri* en diferentes regiones vitivinícolas de Argentina

1. Micoflora en uvas.

Los hongos filamentosos impactan significativamente en la producción y la calidad de los vinos, ya que al afectar a las uvas en el viñedo pueden producir diferentes tintes y aromas en el vino. Además, las uvas mohosas pueden contener micotoxinas que pueden trasladarse a las etapas de producción del vino (Zimmerli y Dick, 1996).

En los viñedos de las zonas vitivinícolas evaluadas, las muestras de uvas presentaron un alto nivel de contaminación fúngica y biodiversidad. En todas las vendimias se observó que los géneros *Alternaria* y *Aspergillus* fueron predominantes, representando el 32,5 % y 19,4 % del total de las cepas aisladas, respectivamente. En general, en las regiones de La Rioja, San Juan y Río Negro se aislaron mayores porcentajes de *Aspergillus*, mientras que los mayores porcentajes de *Alternaria* se aislaron en las regiones de Mendoza (Figuras 14, 15, 16 y 17) (Anexo II, Tabla 8).

Los géneros *Penicillium, Wallemia*, *Cladosporium, Trichoderma*, *Botrytis* y *Fusarium* se aislaron en porcentajes menores de infección y, dependiendo de las regiones y la vendimia, se observaron diferentes niveles de aislamiento.

Las levaduras se aislaron en altos niveles y la frecuencia de aislamiento fue significativa en todas las regiones y vendimias evaluadas. Durante las vendimias 2009/10 y 2010/11 los niveles de infección fueron más altos, representando el 76% y 66%, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que *Alternaria* y *Aspergillus* son los géneros predominantes en los viñedos de las diferentes zonas agroecológicas de Argentina. Previamente Magnoli y col. (2003), evaluaron la micoflora de muestras de uvas de viñedos localizados en la región de Mendoza y demostraron también que *Alternaria* y *Aspergillus* eran los géneros fúngicos aislados en mayor frecuencia, representando el 80% y 70% de los cepas, respectivamente. En los viñedos evaluados de Europa, dichos géneros también representaron la microbiota predominante en las uvas (Valero y col., 2005; Serra y col., 2005, 2006b; Bellí y col., 2006).

Los porcentajes altos de aislamiento del género *Alternaria* en las muestras de uvas podría resultar en la contaminación de los vinos con micotoxinas. Las uvas son un buen sustrato para el desarrollo de *Alternaria alternata* y la producción de alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME) y, dichas toxinas, se han detectado previamente en vinos tintos (Tournas y Stack, 2001; Scott y col., 2006).

La distribución diferencial de los géneros fúngicos observada estaría relacionada a las características climáticas de las zonas, como ha sido demostrado en otras regiones (Serra y col., 2006b). Además, el grado de madurez de las bayas, la variedad, los daños físicos, y las prácticas de vitivinicultura serían otros factores que podrían influenciar la diversidad de la micoflora en los viñedos (Leong, 2007).

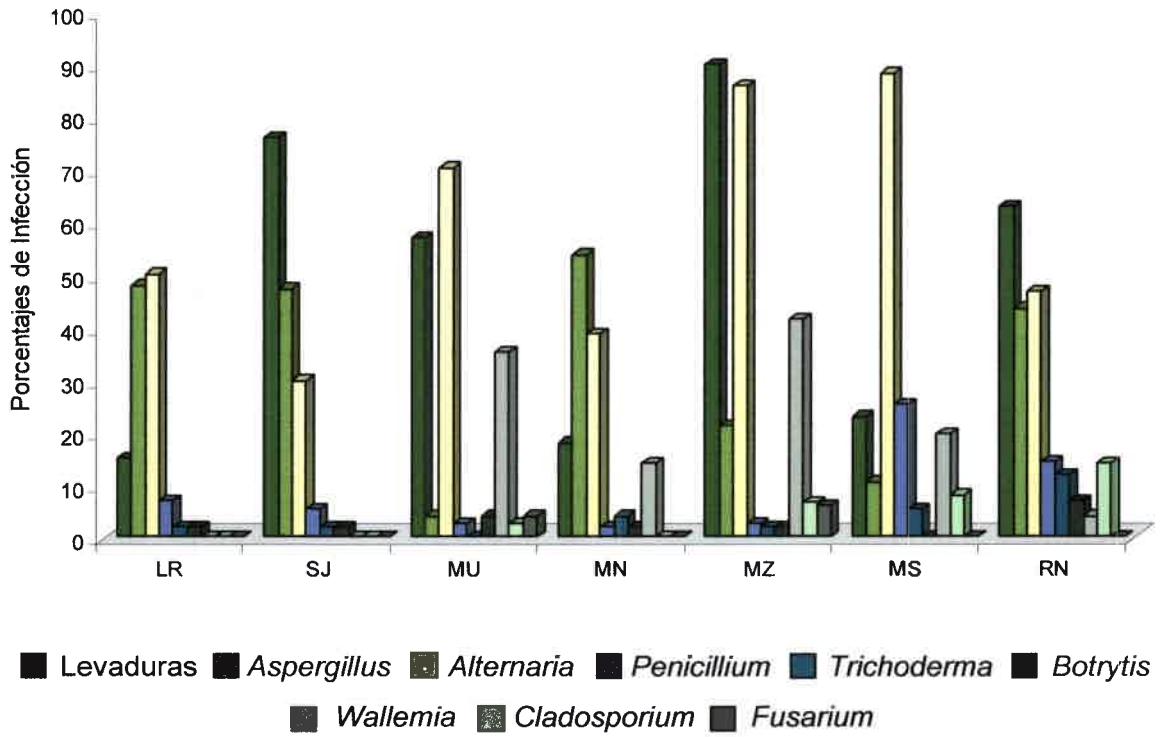


Figura 14. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2007/08. **LR:** La Rioja, **SJ:** San Juan, **MU:** Mendoza Valle de Uco, **MN:** Mendoza Noreste, **MZ:** Mendoza ZARM, **MS:** Mendoza Sur, **RN:** Río Negro - Neuquén.

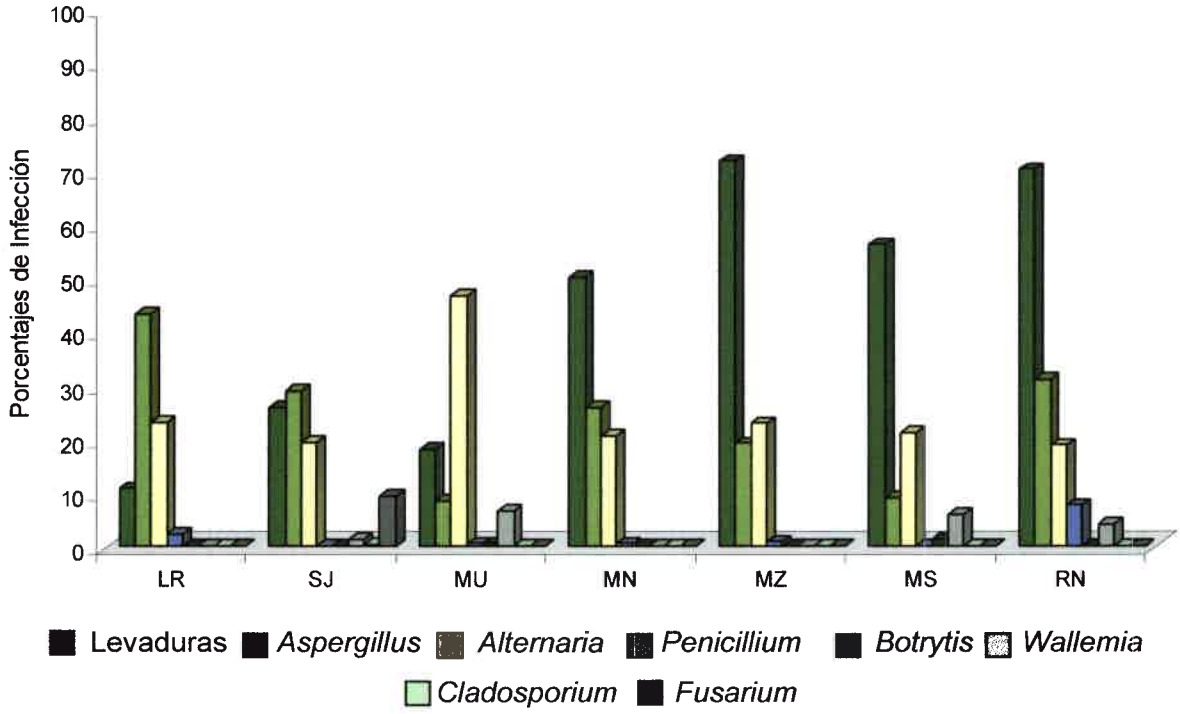


Figura 15. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2008/09. **LR:** La Rioja, **SJ:** San Juan, **MU:** Mendoza Valle de Uco, **MN:** Mendoza Noreste, **MZ:** Mendoza ZARM, **MS:** Mendoza Sur, **RN:** Río Negro-Neuquén.

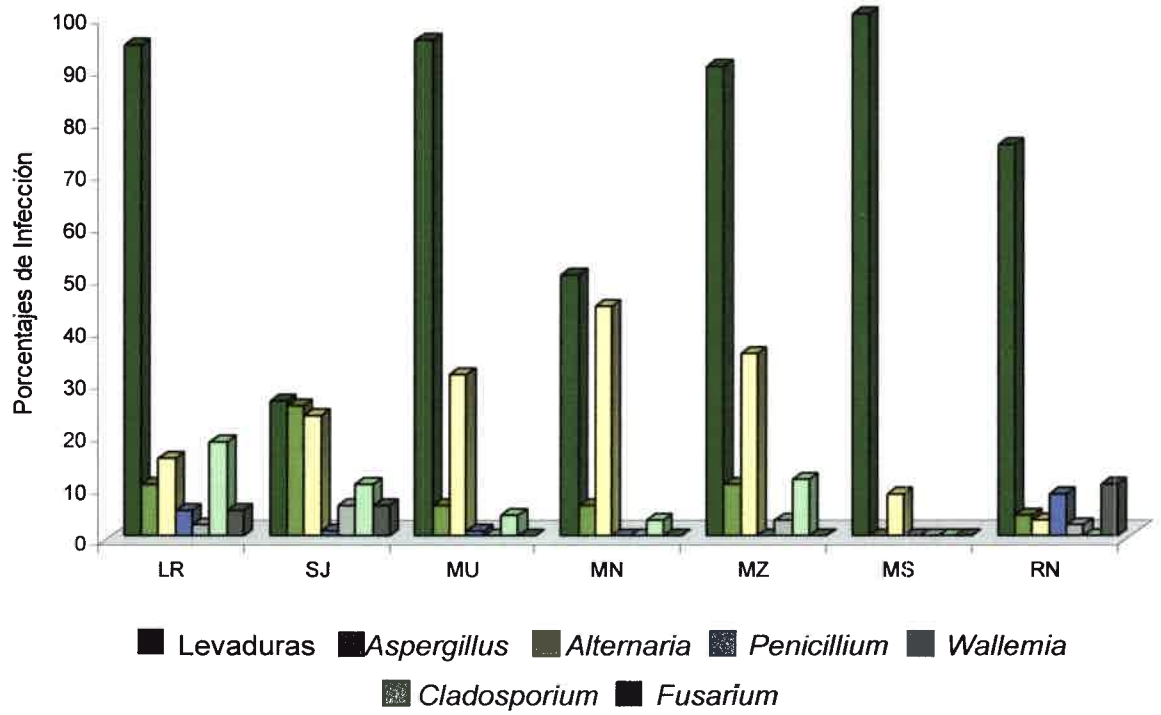


Figura 16. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2009/10. **LR:** La Rioja, **SJ:** San Juan, **MU:** Mendoza Valle de Uco, **MN:** Mendoza Noreste, **MZ:** Mendoza ZARM, **MS:** Mendoza Sur, **RN:** Río Negro-Neuquén.

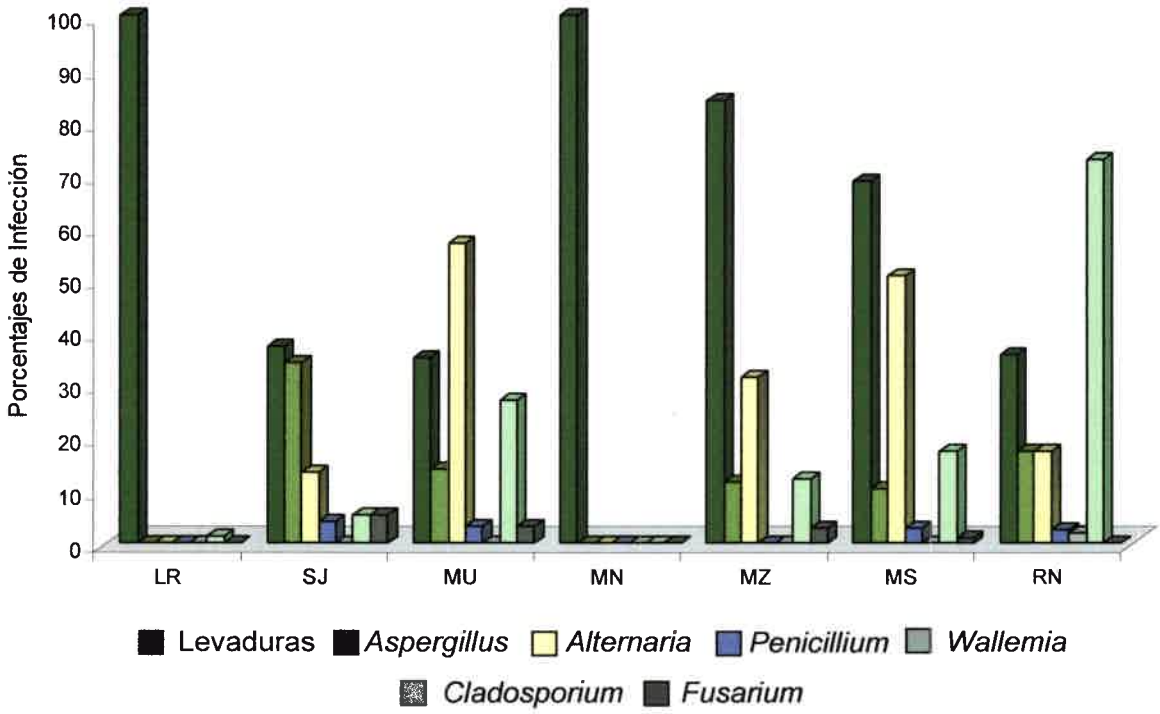


Figura 17. Micoflora aislada de uvas durante la vendimia 2010/11. **LR:** La Rioja, **SJ:** San Juan, **MU:** Mendoza Valle de Uco, **MN:** Mendoza Noreste, **MZ:** Mendoza ZARM, **MS:** Mendoza Sur, **RN:** Río Negro-Neuquén.

2. *Aspergillus* de la sección *Nigri* en uvas.

Las muestras de uvas se recolectaron durante el estadío de cosecha debido a que estudios previos realizados en viñedos de Argentina demostraron que el número de bayas colonizadas por especies de *Aspergillus* sección *Nigri* durante los primeros estadíos de crecimiento era bajo (1,3%), incrementando hasta el 47% en el estadío de madurez (Ponsone y col., 2007)

En el presente estudio, los porcentajes de infección de *Aspergillus* sección *Nigri* variaron de acuerdo a la zona y al año de cultivo evaluado. En las regiones de La Rioja, San Juan y Mendoza Noreste la mayor incidencia se observó durante la vendimia 2007/08, en las regiones Mendoza ZARM y Mendoza Valle de Uco durante la vendimia 2008/09 y en las regiones Mendoza Sur y Río Negro - Neuquén durante la vendimia 2009/10. Diferencias significativas en los porcentajes de infección entre las regiones fueron observadas ($p<0,05$) (Figura 18) (Anexo II, Tablas 1, 2, 3, 4 y 5).

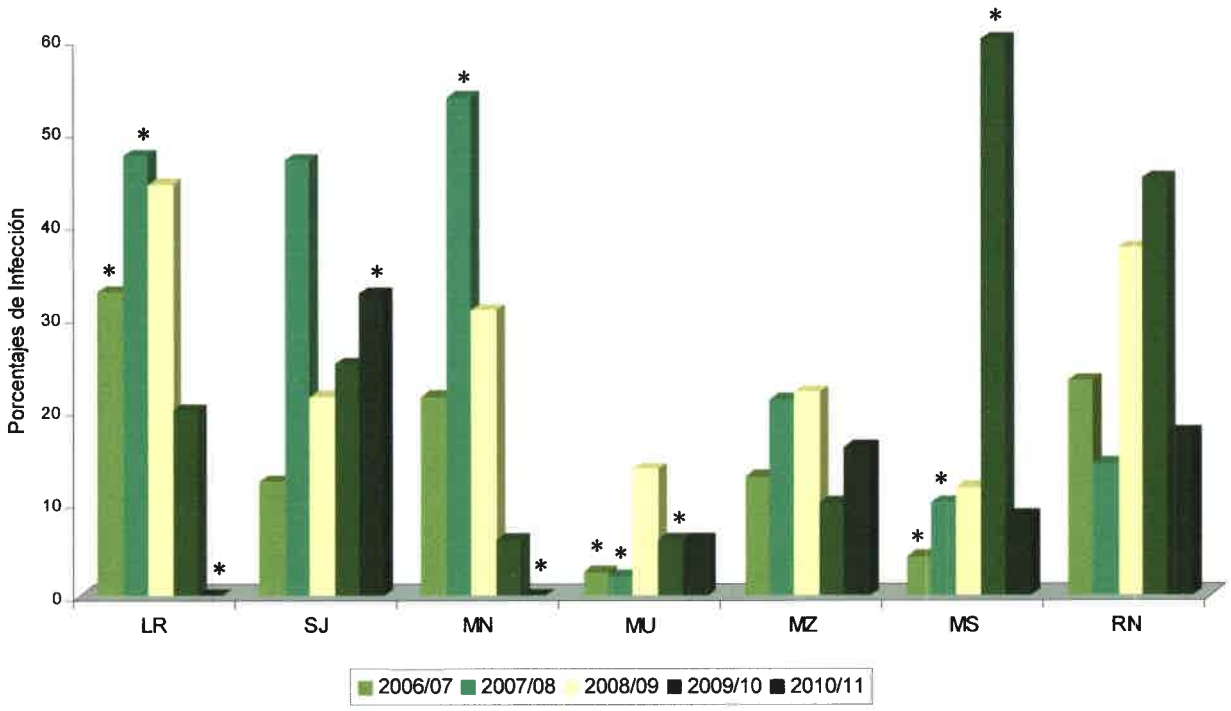


Figura 18. *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina. **LR:** La Rioja, **SJ:** San Juan, **MN:** Mendoza Norte, **MU:** Mendoza Valle de Uco, **MZ:** Mendoza ZARM, **MS:** Mendoza Sur, **RN:** Río Negro-Neuquén. * Diferencias significativas entre las regiones en cada vendimia ($p<0,05$).

En las regiones donde no se observó contaminación por *Aspergillus* sección *Nigri* en las uvas o dicha contaminación fue baja, se observaron mayores niveles de infección de otros géneros fúngicos. La comparación de los porcentajes de infección de *Aspergillus* sección *Nigri, Alternaria* y las levaduras aisladas de las diferentes regiones vitivinícolas se muestra en la figura 19. Dichas poblaciones fueron correlacionadas negativamente, observándose mayores coeficientes de correlación entre *Aspergillus* sección *Nigri* y *Alternaria*, principalmente en la región de La Rioja ($r=0,95$, $p<0,05$) y entre *Aspergillus* sección *Nigri* y las levaduras en la región de San Juan ($r=0,99$, $p<0,001$).

En general, e independientemente del año evaluado, en las regiones ubicadas en el extremo norte del área vitivinícola (La Rioja, San Juan y Mendoza Noreste) y en la región Río Negro - Neuquén se observaron porcentajes de infección mayores en comparación con los obtenidos en las regiones de Mendoza (ZARM, Valle de Uco y Sur). En dichas regiones, las temperaturas registradas previas a la cosecha fueron menores que las registradas en el resto de las regiones evaluadas (Anexo II, Tablas 1, 2, 3 y 4). La relación entre los niveles de infección y la temperatura media se observa claramente en el gráfico biplot (Figura 20).

Los efectos de la humedad relativa y las precipitaciones no mostraron un patrón característico sobre el aumento de la incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri.*

Únicamente las precipitaciones registradas en el estadio de envero temprano y las humedad relativa registrada en el estadio de madurez durante la vendimia 2009/10, se correlacionaron significativamente con los niveles de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* (r=0,76 y r= -0,74, respectivamente) (p< 0,05) (Anexo II, Tablas 6, 7, 8 y 9).

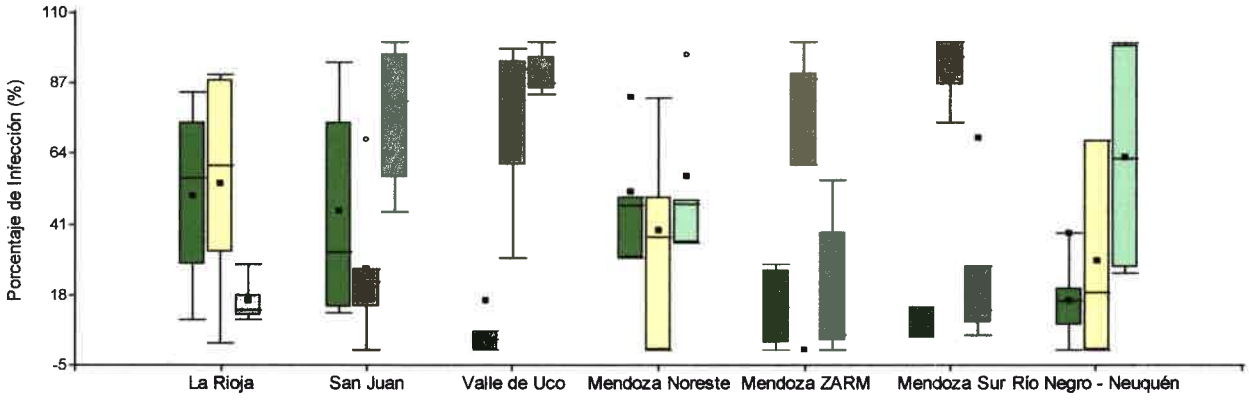


Figura 19. Incidencia de las poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* ( ), *Alternaria* ( ) y las levaduras ( ) en las diferentes regiones vitivinícolas.

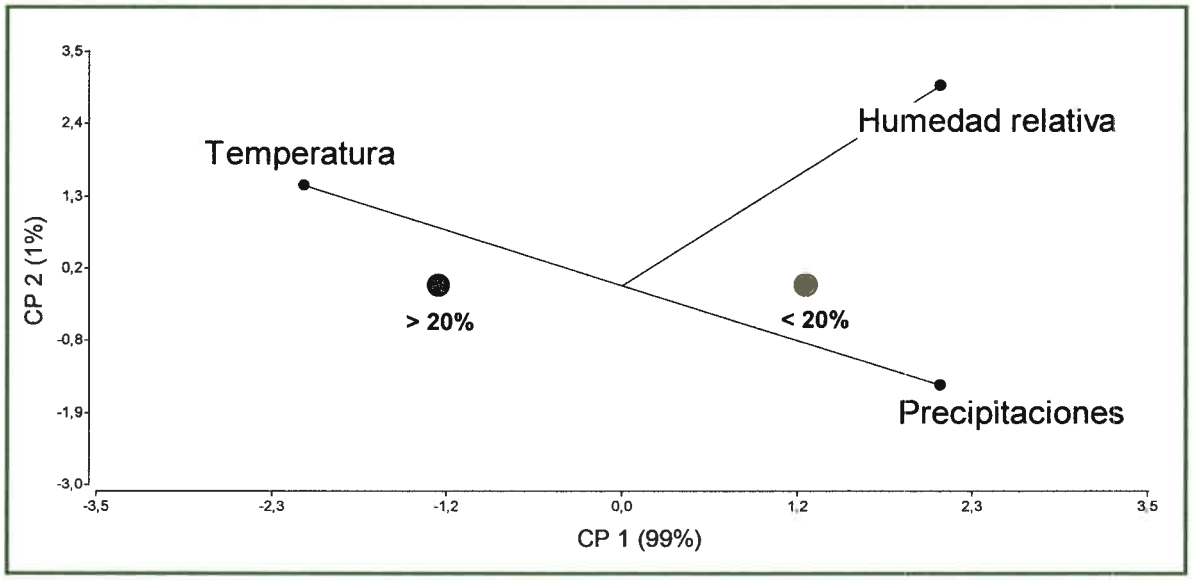


Figura 20. Análisis de componentes principales de los porcentajes de infección de *Aspergillus* sección *Nigri* vs los datos meteorológicos.

Los resultados obtenidos demuestran que el área geográfica, las condiciones climáticas y el año de cultivo, contribuirían a la variación en la incidencia fúngica. En estudios previos, se ha demostrado que en los viñedos donde las temperaturas fueron más elevadas se observó un incremento en la incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y la contaminación con OTA (Battilani y col., 2003a; Roset, 2003; Bellí y col., 2005a). En los estudios *"in vitro"*, se ha demostrado también que las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de las uvas de diferentes orígenes muestran una capacidad óptima de crecimiento a las temperaturas entre 30-37°C (Michell y col., 2003, 2004; Bellí y col., 2004). Apoyando dichos resultados, Parra y Magan, (2004) evaluaron la relación entre las condiciones ambientales y la esporulación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, demostrando que las cepas de *A. niger* producían mayores niveles de esporas/cm^2 a 30-35 °C. Los resultados sugieren que la colonización de *A. niger* en los restos de los cultivos presentes en la superficie del suelo podría dar lugar a una dispersión aérea mayor cuando las temperaturas son más elevadas.

Mientras que el desarrollo fúngico y la producción de OTA son regularmente dependientes de la temperatura, los efectos de las precipitaciones y la humedad parecen ser más irregulares. Battilani y col. (2006b), observaron un efecto significativo de las precipitaciones sobre la colonización fúngica y el contenido de ocratoxina A en los racimos recolectados en los viñedos en Italia. Por el contrario, Belli y col. (2006) en los viñedos españoles no encontraron ninguna correlación. En Grecia, Tjamos y col. (2006) observaron un mayor contenido de OTA en los vinos obtenidos de uvas cosechadas en la isla donde habría condiciones de humedad más elevadas que los obtenidos de uvas cosechadas de la zona continental. En Australia, se observó que la severidad de la infección por las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* era mayor en aquellos años en los cuales las precipitaciones causaron daños en las uvas durante el estadío de cosecha en comparación con los períodos de sequía (Leong y col., 2004).

3. Identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* potencialmente ocratoxigénicas.

La incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* fue similar durante todas las vendimias evaluadas. De las 834 cepas aisladas de las uvas, la mayoría fueron identificadas morfológicamente como especies pertenecientes al agregado *A. niger*, representando el 81,5%, 88,2%, 84,7%, 84,9% y 94,4% de los aislados en las vendimias 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10 y 2010/11, respectivamente (Figura 21). La frecuencia de aislamiento de la especie *Aspergillus carbonarius* fue menor y representó un 9,8%, 6,9%, 8,5%, 15% y 1,9% del total de las cepas aisladas durante las vendimias 2006/07, 2007/08,

2008/09, 2009/10 y 2010/11, respectivamente. Los porcentajes de las especies de *Aspergillus* uniseriadas fueron los más bajos durante todos los períodos de estudio, a excepción de la ultima vendimia donde el porcentaje de cepas de *A. carbonarius* aisladas fue menor (8,6%, 4,9%, 6,8%, 0% y 2,7% en las vendimias 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10 y 2010/11, respectivamente).

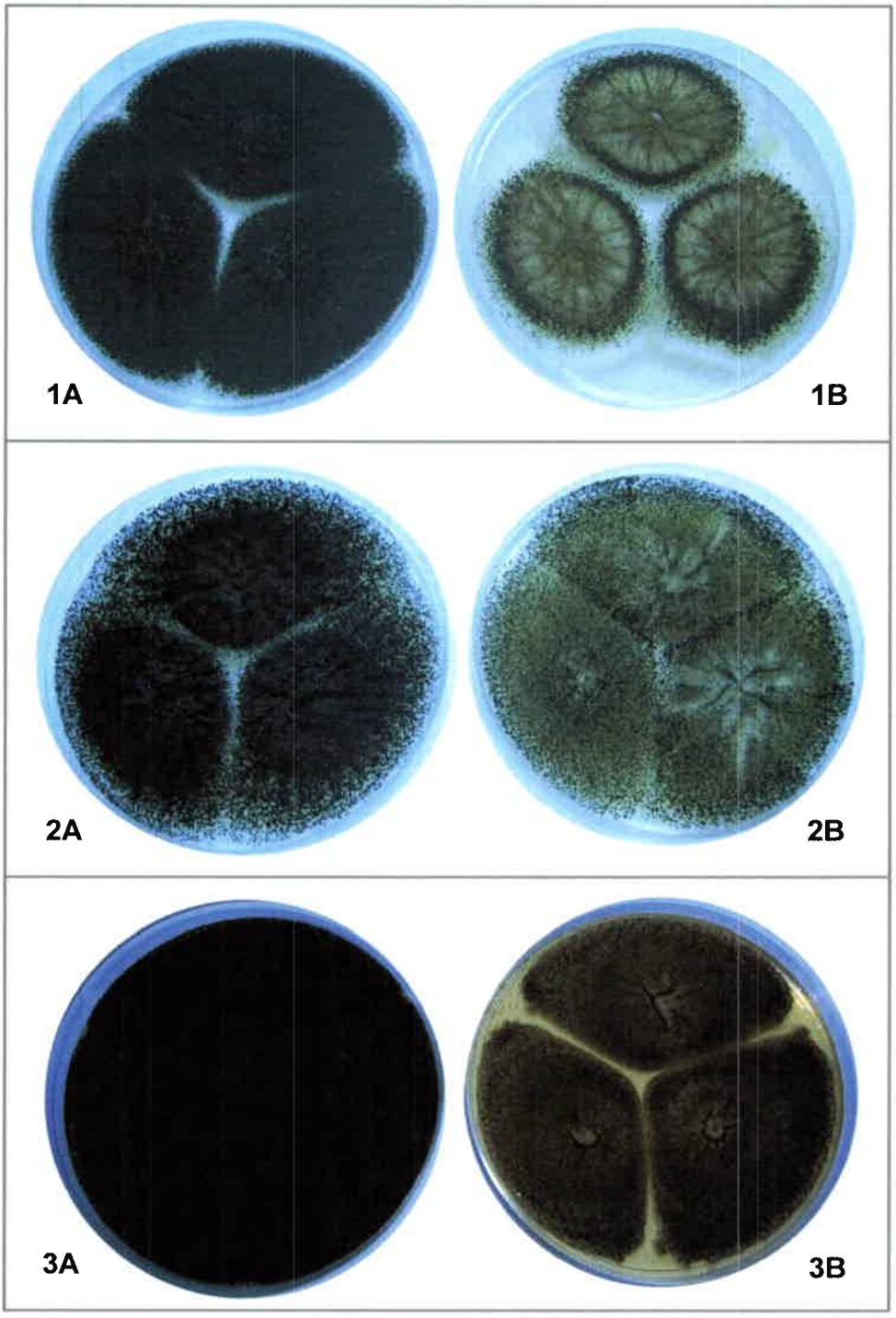


Figura 21. Colonias de las especies del agregado *Aspergillus niger* (1), *Aspergillus carbonarius* (2) y *Aspergillus* uniseriados (3), desarrolladas en agar Czapex extraxto de levadura (CYA) (A) y agar extracto de malta (MEA) (B) a 25°C durante 7 días.

Las muestras de uvas obtenidas de la región de La Rioja exhibieron el índice de biodiversidad de especies (Shannon-Weiner) más alto en comparación con las muestras de las otras regiones durante las vendimias 2006/07, 2007/08 y 2008/09 (0,49, 0,43 y 0,40, respectivamente). En las dos últimas vendimias, los índices fueron mucho más bajos y se observó una mayor diversidad en la región de San Juan (0,23 y 0,13 durante la vendimia 2009/10 y 2010/11, respectivamente) (Tabla 9).

Tabla 9. Índice de diversidad de Shannon-Wiener.

Región	Indice de biodiversidad				
	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11
La Rioja	0,49	0,43	0,40	0,00	-
San Juan	0,28	0,22	0,22	0,23	0,13
Mendoza Norte	0,28	0,00	0,00	0,00	-
Mendoza Valle de Uco	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00
Mendoza ZARM	0,16	0,05	0,00	0,00	0,00
Mendoza SUR	0,00	0,08	0,14	0,00	0,08
Río Negro-Neuquén	0,00	0,00	0,08	0,00	0,10

Las especies pertenecientes al agregado *A. niger* fueron dominantes en todas las regiones vitivinícolas evaluadas. Durante el período 2006/07, en los viñedos de Mendoza Valle de Uco, Mendoza SUR y Neuquén-Río Negro se aislaron únicamente las especies pertenecientes al agregado *A. niger.* Diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento fueron observadas entre Mendoza - Valle de Uco, Mendoza Sur, Río negro-Neuquén y la región de La Rioja ($P<0,05$), ya que en las muestras de ésta última zona los porcentajes de aislamiento del agregado *A. niger* obtenidos fueron menores en comparación al resto de las regiones evaluadas (Figura 22). En el período 2007/08, en los viñedos de Mendoza - Valle de Uco, Mendoza Norte y Río Negro-Neuquén las especies pertenecientes al agregado *A. niger* representaron el 100% de los aislamientos, observándose diferencias significativas con la región de La Rioja ($p<0,05$). Durante el periodo 2008/09, sólo en la región de Mendoza Norte el total de las cepas aisladas se identificaron como pertenecientes al agregado *A. niger,* mientras que, durante el periodo 2009/10 en todas las regiones se aislaron únicamente las especies del agregado *A. niger* con la excepción de la región de La Rioja. Diferencias significativas se observan entre la mayoría de las regiones evaluadas durante las vendimia 2009/10 ($p<0,05$) (Anexo II, Tabla 10 y 11). En el último período, en las regiones de Mendoza Valle de Uco y Mendoza ZARM se aislaron únicamente las especies del agregado *A. niger.* En ambas regiones se observaron diferencias significativas con las regiones de La Rioja y Mendoza Noreste.

Los porcentajes de infección de *Aspergillus carbonarius* fueron relevantes en las regiones de La Rioja y San Juan durante los periodos 2006/07, 2007/08 y 2008/09. En los dos periodos restantes, sólo en la región de San Juan dichos porcentajes fueron mayores que en el resto de las regiones evaluadas. La frecuencia de aislamiento fue diferente significativamente entre la región de La Rioja y las regiones de Mendoza - Valle de Uco, Mendoza Sur, Río Negro –Neuquén en la vendimia 2006/07 y entre la región de La Rioja y las regiones de Mendoza Noreste, Mendoza Sur, Río Negro –Neuquén en la vendimia 2008/09 ($P<0,05$) (Anexo II, Tabla 12).

Los *Aspergillus* uniseriados se aislaron en mayores porcentajes en las provincias de La Rioja, representando el 20%, 24% y 17% en las vendimias 2006/07, 2007/08 y 2008/09, respectivamente. Diferencias significativas se observaron entre la región de La Rioja y las regiones de Mendoza - Valle de Uco, Mendoza Sur, Río Negro –Neuquén en la vendimia 2006/07 y entre la región de La Rioja y las regiones de Mendoza Noreste y San Juan en la vendimia 2008/09 (Anexo II, Tabla 13). Durante la vendimia 2009/10 no se aislaron especies de *Aspergillus* uniseriadas y durante la vendimia 2010/11 se aislaron en bajos porcentajes y sólo en las regiones más ubicadas al sur (Mendoza Sur y Río Negro - Neuquén).

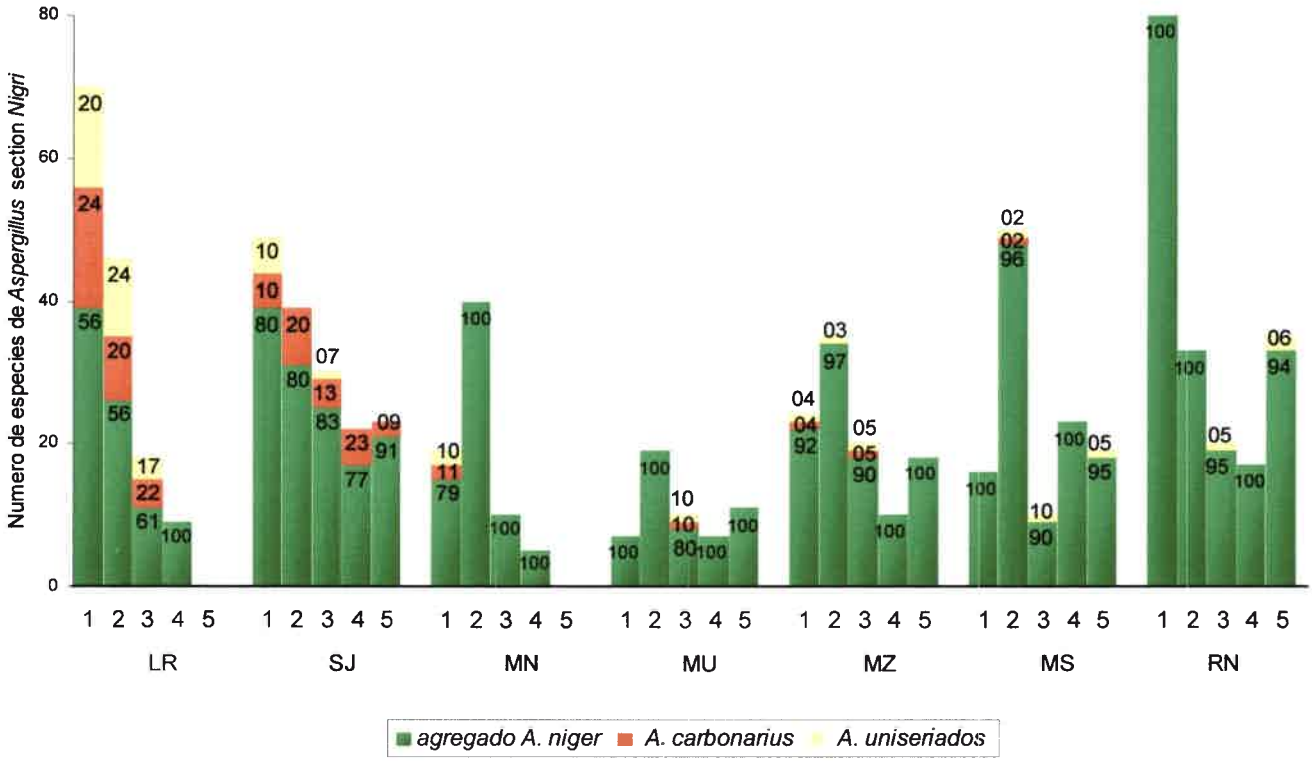


Figura 22. Especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2006/07 (1), 2007/08 (2), 2008/09 (3), 2009/10 (4) y 20010/11 (5). Los valores indicados sobre las barras se refieren a la frecuencia de aislamiento (en %) de las distintas especies en cada región. **LR:** La Rioja, **SJ:** San Juan, **MN:** Mendoza Noreste, **MU:** Mendoza Valle de Uco, **MZ:** Mendoza ZARM, **MS:** Mendoza SUR, **RN:** Río Negro-Neuquén.

Los resultados obtenidos demostraron que las especies pertenecientes al agregado *A. niger* predominan en todos los viñedos de las regiones vitivinícolas de Argentina evaluadas. Los resultados son coincidentes con los datos obtenidos en Europa y Australia, en los cuales se evaluó la distribución de las especies pertenecientes a la sección *Nigri* en muestras de uvas (Cabañes y col., 2002; Sage y col., 2002, 2004; Tjamos y col., 2004; Bau y col., 2005; Bellí y col., 2005a; Serra y col., 2005, 2006b; Battilani y col., 2006a,b; Leong y col., 2006a,b). Estudios previos realizados en Argentina, demostraron que *A. niger var. niger* era la especie prevalente dentro de los *Aspergillus* de la sección *Nigri* aislados de uvas y pasas de uva (Magnoli y col., 2003, 2004). La prevalencia de dicha especie se atribuye al rango amplio de temperaturas en el cual pueden crecer y a su velocidad de crecimiento rápida (Battilani y col., 2003b; Bellí y col., 2004, 2005a; Leong y col., 2006c).

Aunque *A. carbonarius* no fue la especie dominante en los viñedos analizados, su aislamiento es relevante debido a que dentro de la sección *Nigri* es la especie que presenta el mayor número de cepas productoras de OTA y los niveles de la toxina producidos son elevados.

Los porcentajes bajos de aislamiento de las especies uniseriadas no sería relevante en la contaminación de las uvas, y aunque algunos autores han señalado la capacidad de las especies uniseriadas de la sección para producir OTA, este hecho requiere confirmación ya que los datos sobre capacidad toxigénica no son concluyentes (Dalcero y col., 2002; Battilani y col, 2003a; Magnoli y col., 2004; Ponsone y col., 2007). Sin embargo, es importante destacar que dichas especies fueron aisladas en las mismas regiones vitivinícolas que *A. carbonarius,* ya que las condiciones de crecimiento son similares como fue demostrado previamente en otros estudios (Visconti y col., 2008).

4. Capacidad toxigénica de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri.*

Entre las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* evaluadas durante la vendimia 2006/07 el 39% fueron productoras de ocratoxina A, en niveles que variaron entre 0,1 y 1.285 ng/gr (Figura 23). El 72% de las cepas productoras fueron identificadas como *Aspergillus* del agregado *A. niger* y el 28% restante, como *A. carbonarius.* En las demás vendimias, se observó un menor porcentaje de cepas toxigénicas (16-23%) pero los niveles de ocratoxina A producidos fueron mayores, a excepción de la vendimia 2009/10, y variaron entre 0,1 y 7.583 ng/gr. Entre las cepas ocratoxigénicas evaluadas durante las vendimias 2007/08, 2008/09, 2009/10 y 2010/11, el 59%, 57%, 33% y 87% fueron identificadas como *Aspergillus* del agregado *A. niger* y el 41%, 43%, 67% y 13% restantes, como *A. carbonarius*, respectivamente. Las especies de *Aspergillus* uniseriadas aisladas en todas las vendimias evaluadas no fueron productoras de OTA (Tabla 2).

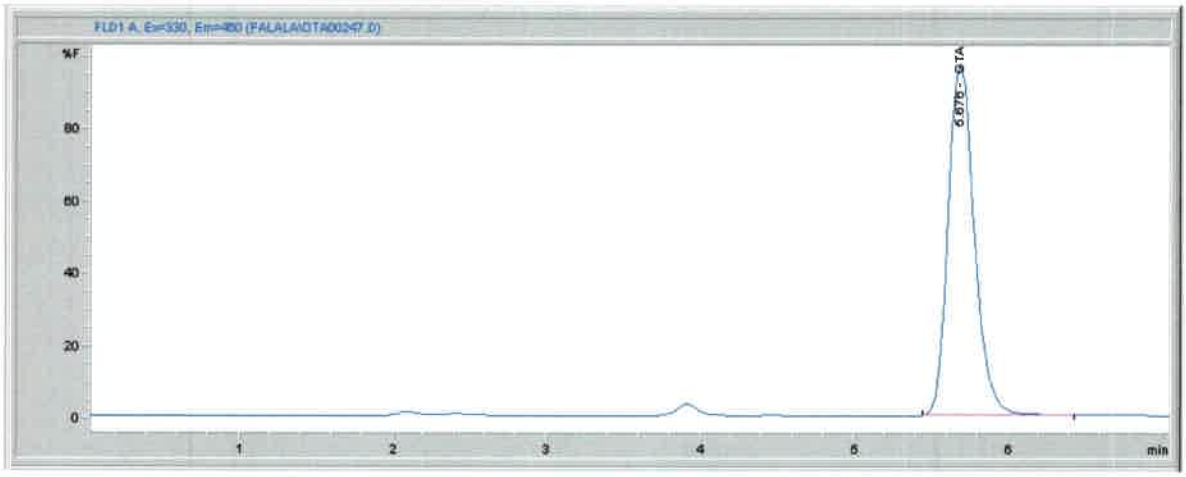


Figura 23. Cromatograma de ocratoxina A producida por una cepa de *A. carbonarius* desarrollada en el medio de cultivo agar Czapex extracto de levadura (CYA), incubada a 25°C durante 7 días.

El 100% de cepas de *A. carbonarius* fueron toxigénicas y los niveles de producción de OTA variaron de acuerdo a la vendimia evaluada. Durante la vendimia 2007/08 se observaron los mayores niveles con una media de producción de 1.442 ng/gr, mientras que, las cepas aisladas en las otras vendimias produjeron OTA con medias de producción que variaron entre 45 y 252 ng/gr.

Entre las especies pertenecientes al agregado *A. niger,* un número menor de cepas fueron toxigénicas durante la vendimia 2007/08, 2008/09 y 2009/10 en comparación a las vendimias 2006/07 y 2010/11, pero los niveles de producción detectados fueron mayores, principalmente durante la vendimia 2007/08 con una media de producción de 118 ng/gr (Tabla 10).

El mayor porcentaje de cepas productoras de OTA fueron aisladas en las muestras cosechadas en la región de La Rioja y Mendoza Valle de Uco durante las vendimias 2006/07 (48% y 71%, respectivamente) y 2008/09 (33% en ambas regiones). Durante las vendimias 2007/08 y 2009/10, los porcentajes mayores de contaminación fueron observados en las regiones de La Rioja y San Juan, representando el 51%, 100% y 26%, 41%, respectivamente; mientras que, en la vendimia 2010/11 en las regiones de Mendoza ZARM y San Juan se observaron los mayores porcentajes (30% y 26%, respectivamente).

Entre las cepas clasificadas dentro del agregado *A. niger* se aislaron cepas productoras de OTA en la mayoría de los viñedos analizados; mientras que, las cepas de *A. carbonarius* sólo fueron aislados en algunas regiones, con el mayor porcentaje de aislamiento en las muestras obtenidas de las provincia de La Rioja y San Juan, 34% y 15,3%, respectivamente. En el resto de las regiones, los porcentajes de cepas de toxigénicas de *A. carbonarius* fueron menores.

La frecuencia de cepas toxicigénicas aisladas entre las especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* en el presente estudio, son similares a las observadas en los viñedos de España (Cabañes y col., 2002; Abarca y col., 2004; Bau y col., 2005), Italia (Battilani y col., 2006a,b,c), Francia (Sage y col., 2002, 2004), Portugal (Serra y col., 2003, 2005, 2006b), Australia (Leong y col., 2006a) y Chile (Diaz y col., 2009; Vega y col., 2011).

La presencia de *A. carbonarius* en las zonas vitivinícolas de La Rioja y San Juan es de relevancia, debido al alto porcentaje de cepas toxigénicas y a los niveles de producción de toxina. Además, se ha demostrado que su potencial ocratoxigénico no sólo es debido a su toxicidad intrínseca, sino también al carácter invasivo de dicha especie para colonizar y penetrar las uvas no dañadas (Battilani y col., 2002). Sin embargo, aunque las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* producen niveles bajos de OTA, podrían contribuir a la contaminación de las uvas debido a su alta incidencia en los viñedos.

Tabla 10. Producción de ocratoxina A por las cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*.

Regiones	Vendimia	Especies	Número de cepas positivas / total [1]	Rango de OTA (ng/gr) [2]	Media [3]
La Rioja	2006/07	agregado *A.niger*	10/39	0,1 – 8,4	2,5
		A. carbonarius	17/17	0,4 – 1.285	230
	2007/08	agregado *A.niger*	9/26	0,7 – 2.590	310
		A. carbonarius	9/9	30 – 3.214	1139
	2008/09	agregado *A.niger*	1/11	8,2	8,2
		A. carbonarius	4/4	2,9 – 515,5	290
	2009/10	agregado *A.niger*	0/0	-	-
		A. carbonarius	9/9	4,7 – 426	244
	2010/11	agregado *A.niger*	-	-	-
		A. carbonarius	-	-	-
San Juan	2006/07	agregado *A.niger*	9/39	0,1 – 6,7	1,3
		A. carbonarius	5/5	1,2 – 770	236
	2007/08	agregado *A.niger*	2/31	5,0 – 60	33
		A. carbonarius	8/8	1,0 – 7.583	1604
	2008/09	agregado *A.niger*	3/25	9,6 - 89	36
		A. carbonarius	4/4	1,9 - 287	124
	2009/10	agregado *A.niger*	4/17	9,9 – 86,3	41
		A. carbonarius	5/5	16,8 – 113	72
	2010/11	agregado *A.niger*	4/21	0,1 – 5,2	1,6
		A. carbonarius	2/2	1.297 – 2.226	1761
Mendoza Noreste	2006/07	agregado *A.niger*	4/15	0,2 – 18	5,1
		A. carbonarius	2/2	37 - 501	269
	2007/08	agregado *A.niger*	4/40	0,3 – 51	15
		A. carbonarius	-	-	-
	2008/09	agregado *A.niger*	0/10	ND	-
		A. carbonarius	-	-	-
	2009/10	agregado *A.niger*	0/5	ND	-
		A. carbonarius	-	-	-
	2010/11	agregado *A.niger*	-	-	-
		A. carbonarius	-	-	-

Continuación Tabla 10.

Regiones	Vendimia	Especies	Número de cepas positivas / total [1]	Rango de OTA (ng/gr) [2]	Media [3]
Mza Valle de Uco	2006/07	agregado *A.niger*	5/7	0,1 – 17	4,6
		A. carbonarius	-	-	-
	2007/08	agregado *A.niger*	1/19	3,9	3,9
		A. carbonarius	-	-	-
	2008/09	agregado *A.niger*	2/8	276 – 342	309
		A. carbonarius	1/1	275	275
	2009/10	agregado *A.niger*	0/7	ND	-
		A. carbonarius	-	-	-
	2010/11	agregado *A.niger*	0/11	ND	-
		A. carbonarius	-	-	-
Mendoza ZARM	2006/07	agregado *A.niger*	10/22	0,3 – 4,2	1,8
		A. carbonarius	1/1	2,9	2,9
	2007/08	agregado *A.niger*	6/34	0,3 – 5,4	1,4
		A. carbonarius	-	-	-
	2008/09	agregado *A.niger*	0/10	ND	-
		A. carbonarius	-	-	-
	2009/10	agregado *A.niger*	1/10	61	61
		A. carbonarius	-	-	-
	2010/11	agregado *A.niger*	3/10	LD	LD
		A. carbonarius	-	-	-
Mendoza Sur	2006/07	agregado *A.niger*	7/16	0,1 – 3,6	2,2
		A. carbonarius	0/0	-	-
	2007/08	agregado *A.niger*	3/478	11 – 20	15
		A. carbonarius	1/1	7.356	7.356
	2008/09	agregado *A.niger*	1/9	295	295
		A. carbonarius	-	-	-
	2009/10	agregado *A.niger*	1/23	7,4	7,4
		A. carbonarius	-	-	-
	2010/11	agregado *A.niger*	1/18	LD	LD
		A. carbonarius	-	-	-
Neuquén Río Negro	2006/07	agregado *A.niger*	20/69	0,1 – 12	2,4
		A. carbonarius	-	-	-
	2007/08	agregado *A.niger*	1/33	LD	LD
		A. carbonarius	-	-	-
	2008/09	agregado *A.niger*	5/19	5 – 284	178
		A. carbonarius	-	-	-
	2009/10	agregado *A.niger*	1/17	13	13
		A. carbonarius	-	-	-
	2010/11	agregado *A.niger*	5/33	0,1 – 4,3	0,9
		A. carbonarius	-	-	-

[1] N° de cepas productoras de OTA/total de cepas analizadas.
[2] Rango de los niveles de OTA producidos.
[3] Niveles medios de OTA producidos.
ND: niveles de OTA no detectados.
Límite de detección: 0.05 ng/gr.

5. Influencia de las coordenadas geográficas sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*.

El área geográfica seleccionada para el muestreo de los viñedos de las diferentes regiones vitivinícolas estudiadas, se sitúa entre 67° - 69° de longitud Oeste y 29° - 39° de latitud Sur (Figura 24).

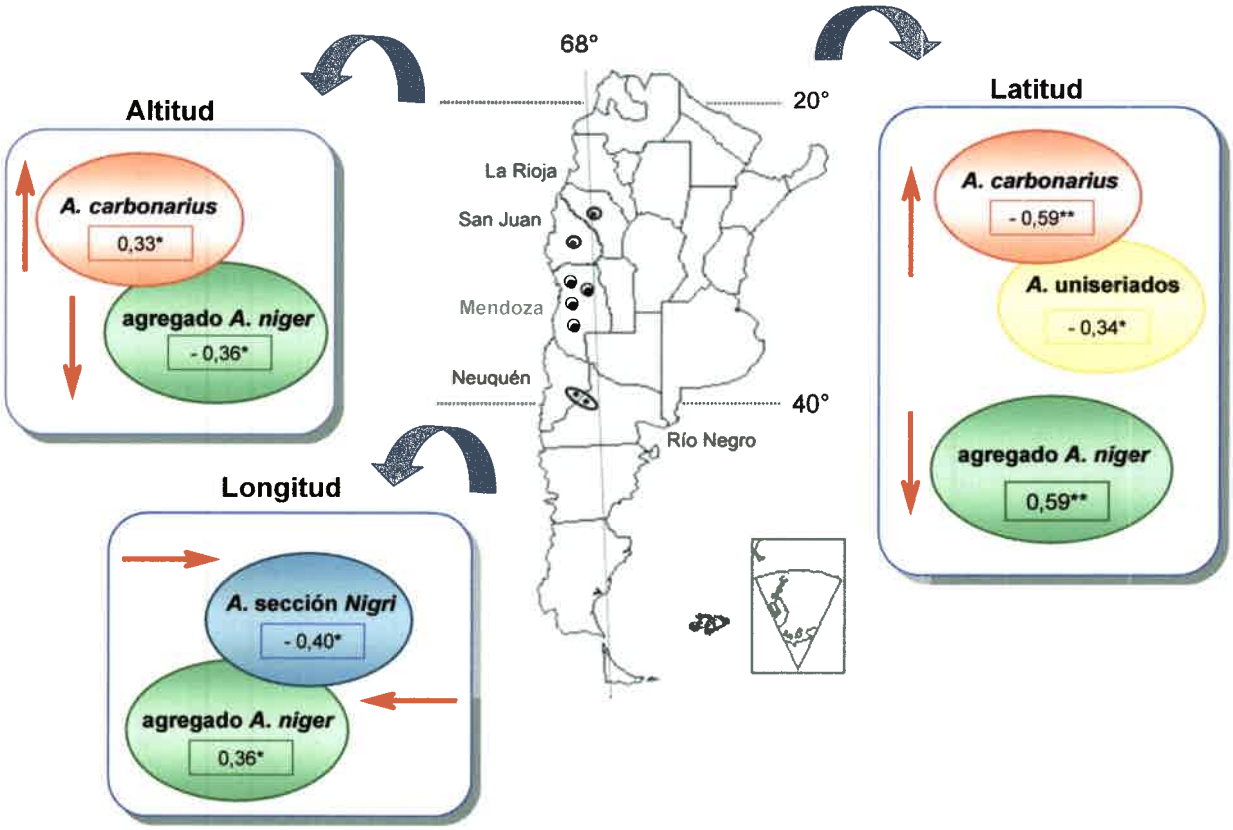


Figura 24. Coeficientes de correlación de Pearson entre las coordenadas geográficas, la altitud y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

La incidencia de bayas infectadas por las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* fue correlacionada significativamente con las coordenadas geográficas. Una correlación negativa fue obtenida entre el total de *Aspergillus* negros aislados de las uvas y la longitud, indicando que su incidencia incrementa de oeste a este. Particularmente, el porcentaje de las especies pertenecientes al agregado *A. niger* aumenta a mayor longitud. La altitud también influyó sobre los porcentajes de aislamiento de las especies. En las regiones de mayor altitud se observa una mayor incidencia de *A. carbonarius*, mientras que la incidencia del agregado *A. niger* disminuye con la altura.

Por otro lado, con la latitud se observó una correlación positiva con el agregado *A. niger* y negativa con *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados. Dicha correlación muestra que la

frecuencia de aislamiento de las especies incluidas en el agregado *A. niger* aumenta hacia el sur de Argentina, mientras que la frecuencia de aislamiento de *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados es mayor en las regiones del norte del país.

Las variables altitud, longitud y latitud influyeron sobre la distribución diferencial de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en el sur de Europa e Israel, donde un análisis geoestadístico fue utilizado para determinar las regiones de alto riesgo de contaminación con las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y la producción de ocratoxina A. La mayor incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri* se observó durante el estadio de cosecha y, su variabilidad espacial fue correlacionada significativamente con la latitud y la longitud, mostrando un gradiente positivo de Oeste-Este y de Norte-Sur (Battilani y col., 2006a).

La región geográfica es relevante en la frecuencia de aislamiento de una especie particular, pero se encuentra intrínsicamente relacionada a las condiciones de temperatura y humedad registradas en cada zona como también ha sido postulado por Battilani y col. (2004b) y Visconti y col. (2008).

6. Influencia de los factores ambientales sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*.

Argentina presenta una amplia extensión latitudinal con variaciones ecológicas que posibilitan la separación de diferentes regiones vitivinícolas bien delimitadas. Las condiciones meteorológicas juegan un rol importante en la determinación de las áreas y los años de riesgo de contaminación con ocratoxina A, y la predicción de los niveles de riesgo pueden ser utilizados para diseñar prácticas de manejo en los viñedos a fin de reducir la contaminación con la toxina (Battilani, 2008).

Entre los parámetros evaluados en el presente estudio, la temperatura fue el factor que tuvo mayor influencia sobre el porcentaje de aislamiento de las diferentes especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*, debido a que el mismo comportamiento se observó en la mayoría de las vendimias evaluadas (Anexo II, Tablas 6, 7, 8 y 9). La incidencia de *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados correlacionó positivamente, tanto con la temperatura máxima, como con la media y mínima; mientras que con las especies del agregado *A. niger* la correlación fue negativa (Anexo II, Tablas 14, 15, 16, 17 y 18). Dicha correlación demostró que la frecuencia de aislamiento de *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados aumentó a medida que aumentó la temperatura; mientras que, la frecuencia de aislamiento de las especies del agregado A. *niger* aumentó a medida que disminuyó la temperatura.

Entre las precipitaciones y las poblaciones del agregado *A. niger* se observó una correlación negativa, fue estadísticamente significativa durante el estadio de cuaje y

madurez en la vendimia 2007/08 y en el estadio de envero tardío durante la vendimia 2009/10 (r= -0,76, r= -0,82 y r= -0,88, respectivamente) ($p<0,05$). En cambio, los niveles de precipitaciones registradas durante los estadios evaluados y las cepas de *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados correlacionaron positivamente. Diferencias significativas se observaron en la vendimia 2009/10 durante el estadio envero tardío y la vendimia 2007/08 durante todos los estadios para *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados, respectivamente ($p<0,05$). Con la humedad relativa se obtuvo el mismo comportamiento en los viñedos en todos los estadios evaluados y particularmente, en el periodo de cuaje y envero temprano durante la vendimia 2007/08, se observaron diferencias significativas para las poblaciones del agregado *A. niger y A. carbonarius* (r= -0,80, r= -0,63 y r= 0,89, r= 0,74, respectivamente) ($p<0,05$) (Anexo II, Tablas 14 y 15). Estos resultados indican que las poblaciones de *A. carbonarius* y los *A.* uniseriados predominaron en regiones con mayores niveles de humedad y precipitaciones, inversamente a lo observado con las especies pertenecientes al agregado *A. niger*.

El gráfico biplot obtenido a partir del análisis multivariado (Figura 25) muestra la interacción de las variables climáticas evaluadas (temperatura máxima, media y mínima, humedad relativa y precipitaciones), los porcentajes de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de producción de OTA.

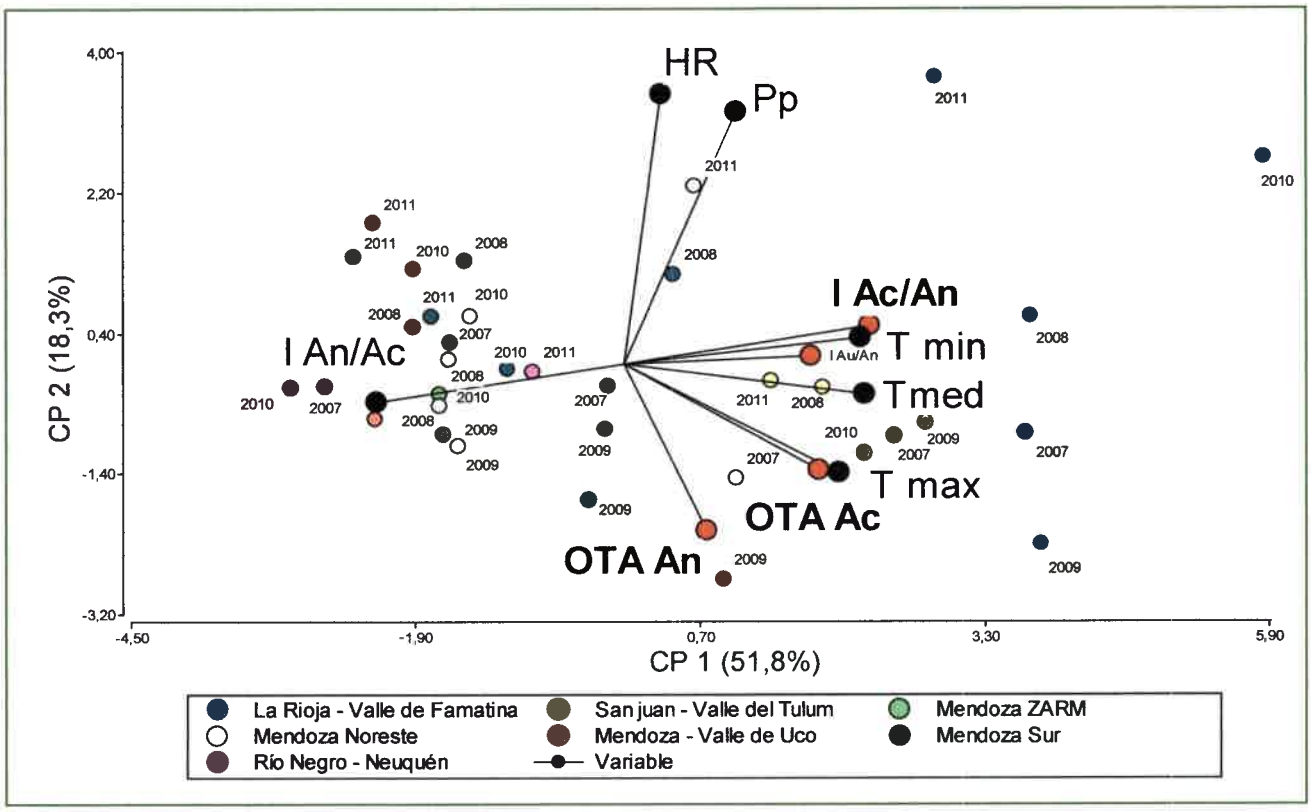


Figura 25. Análisis de Componentes Principales de los condiciones meteorológicas registradas previo a la cosecha vs los porcentajes de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de OTA producidos. An: agregado *A. niger*, Ac: *A. carbonarius*, Au: *A.* uniserisados, I: índice de transformación de Atkinson.

La variabilidad regional fue mayor que la variabilidad inter-anual. Sin embargo, algunas regiones dependiendo de la vendimia evaluada estuvieron más estrechamente relacionadas a alguna variable climática en particular que otra, lo cual influyó en la variabilidad de los porcentajes de aislamiento de las especies. En general, los mayores porcentajes de *A. carbonarius* y *A.* uniseriados se observaron en las regiones de La Rioja y San Juan, donde se registraron las temperaturas más altas. Mientras que las especies del agregado *A. niger* se aislaron en mayores niveles en el resto de las regiones evaluadas. El análisis de correlación canónica muestra claramente que las temperaturas medias más altas influyeron sobre el mayor aislamiento de *A. carbonarius* ($r=0,87$, $p<0,001$).

Las cepas de *A. carbonarius* con mayor potencial para producir OTA se aislaron con mayor frecuencia en las regiones vitivinícolas donde se registraron las temperaturas más altas, independientemente de la vendimia evaluada (Figura 25 y Tabla 11). Las condiciones de humedad y las precipitaciones también influyeron en su aislamiento pero en forma variable, dependiendo del año y el estadio de crecimiento de las uvas (Tabla 13).

La influencia de los datos meteorológicos sobre los niveles de OTA producidos por las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* no fue tan marcada e independientemente de la vendimia evaluada como en el caso de *A. carbonarius* (Tablas 12 y 13).

Tabla 11. Correlación entre los parámetros meteorológicos y los niveles de ocratoxina A producidos por la especie *A. carbonarius*, independientemente de la vendimia evaluada.

Parámetros meteorológicos	*A. carbonarius*			
	Cuaje	E. temprano	E. tardío	Madurez
T máxima (°C)	0,62**	0,48*	0,57**	0,58*
T media (°C)	0,83**	0,69**	0,73**	0,73*
T mínima (°C)	0,79**	0,74**	0,70**	0,66*
HR (%)	-	0,41*	-	-
PP (mm)	-	-	-	-

E: envero, *T*: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

Tabla 12. Correlación entre los parámetros meteorológicos y los niveles de ocratoxina A producidos por las especies del agregado *A. niger*, independientemente de la vendimia evaluada.

Parámetros meteorológicos	agregado *A. niger*			
	Cuaje	E. temprano	E. tardío	Madurez
T máxima (°C)	-	-	-	-
T media (°C)	-	-	-	-
T mínima (°C)	-	0,41*	-	-
HR (%)	-	-	-	-
PP (mm)	-	-	-	-

E: envero, *T*: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

Tabla 13. Correlación entre los parámetros meteorológicos y los niveles de ocratoxina A producidos por las especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* durante todas las vendimias evaluadas.

Datos meteorológicos	Vendimia	agregado *A. niger*				*A. carbonarius*			
		Cuaje	E. Temprano	E. tardío	Madurez	Cuaje	E. Temprano	E. Tardío	Madurez
***T* máxima**	2006/07	-	-	-	-	0,43	-	0,52	-
	2007/08	0,55	0,49	-	-	0,77*	0,70	0,64	0,75*
	2008/09	-	-	0,42	0,43	0,47	0,40	0,5	-
	2009/10	-	-	-	-	0,74*	0,80*	0,82*	0,83*
	2010/11	0,69	0,47	0,45	0,61	0,69	0,47	0,45	0,61
***T* media**	2006/07	0,46	-	-	-	0,83*	0,64	0,65	0,68
	2007/08	0,46	0,54	-	0,55	0,90*	0,96**	0,90*	0,97**
	2008/09	-	-	-	-	0,60	-	0,59	0,58
	2009/10	-	-	-	-	0,95**	0,94**	0,92*	0,93*
	2010/11	0,89*	0,90*	0,93*	0,92*	0,89*	0,90*	0,92*	0,92*
***T* mínima**	2006/07	0,60	0,45	0,47	0,49	0,88*	0,64	0,65	0,68
	2007/08	0,48	0,65	0,46	0,77*	0,90*	0,95**	0,95**	0,90*
	2008/09	-	-	-	-	0,55	0,57	0,54	0,65
	2009/10	-	-	-	-	0,88*	0,89*	0,84	0,83*
	2010/11	0,72	0,80	0,85*	-	0,72	0,80*	0,85*	0,66
HR (%)	2006/07	-	0,62	0,40	-	-	0,42	-	0,45
	2007/08	0,62	0,52	0,49	0,58	0,89*	0,61	-	0,47
	2008/09	-	-	-	-	-	0,45	-	0,55
	2009/10	-	- 0,56	-	-0,79*	-	-	-	-
	2010/11	-	0,96*	-	-	-	0,96*	-	-
PP (mm)	2006/07	-	-	-	-	-	0,52	-	0,57
	2007/08	0,43	-	0,50	0,55	0,60	0,43	0,49	0,70
	2008/09	0,62	0,58	0,64	-	-	-	-	-
	2009/10	-	-	-	-	0,39	-	0,64	-
	2010/11	-	-	-	-	-	-	-	-

E: envero, *T*: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

El rol de la temperatura y la actividad acuosa (a_w) sobre la supervivencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* es compleja. En el presente estudio se observó una correlación positiva entre la temperatura y *A. carbonarius*; mientras que, entre los porcentajes de aislamiento de las especies del agregado *A. niger* y la temperatura la correlación fue negativa. Es importante aclarar que dicha correlación no se debe a un menor número de cepas del agregado *A. niger* aisladas en las regiones más cálidas sino al aumento en los porcentajes de aislamiento de las poblaciones de *A. carbonarius* y las especies uniseriadas. En estudios previos, las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* han mostrado tener mayores tasas de crecimiento que las cepas de *A. carbonarius* a temperaturas superiores a 20°C (Mitchell y col., 2003; Belli y col., 2004, Leong y col., 2007; Astoreca y col., 2010). Las temperaturas óptimas de crecimiento de las cepas del agregado *A. niger* varían entre los 35-37°C, mientras que *A. carbonarius* crece más rápidamente alrededor de los 30°C. Sin embargo, en el rango de 0,90-0,99 a_w, *A. carbonarius* ha demostrado crecer de manera óptima a 0,98-0,99, mientras que el agregado *A. niger* no muestran diferencias en el rango crecimiento de 0,90 a 0,995 (Mitchell y col., 2003; Bellí y col., 2004b, 2005a). La mayor tasa de crecimiento y tolerancia a un amplio rango de temperaturas y a_w, explicaría el aislamiento en mayor frecuencia de las cepas del agregado *A. niger* en todas las regiones vitivinícolas evaluadas, mientras que *A. carbonarius* mostró una incidencia mayor en las la regiones del norte donde se registraron mayores niveles de temperatura y humedad.

La mayor incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* no necesariamente implicaría una mayor producción de OTA en las uvas. Las condiciones ecológicas que favorecen el crecimiento de las cepas son diferentes de las que permiten una óptima producción de OTA. La mayor producción de OTA por las cepas de *A. carbonarius* aisladas de las uvas de diferentes regiones geográficas se produce en el rango de 0,95-0,99 a_w, y a una temperatura de 20°C, seguido de 15°C, y con una disminución notablemente en el rango de 30-37°C (Mitchell y col., 2004; Belli y col., 2004, 2005b). Sin embargo, en el presente estudio el aislamiento de las cepas de *A. carbonarius* con mayor potencial para producir OTA se vio favorecido en las regiones con temperaturas más altas, lo cual sugiere un riesgo potencial de contaminación con OTA debido al hecho de que en dichas regiones se observa un gran amplitud térmica: temperaturas altas registradas durante el día que favorecerían el crecimiento fúngico y temperaturas bajas registradas durante la noche que favorecerían la producción de OTA.

Por lo tanto, la integración de los datos geográficos del clima y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, principalmente de *A. carbonarius* se podría utilizar para predecir el alto o bajo riesgo de contaminación con OTA en las uvas. Esto permitiría una adecuada aplicación de fungicidas y/o biopesticidas para tratar de

controlar la contaminación de las bayas maduras y reducir al mínimo la posibilidad que cepas potencialmente toxigénicas se establezcan.

7. Influencia de las prácticas de manejo en los viñedos sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*.

7.1 Sistemas de conducción.

La vid es una planta que necesita de una estructura de sostén o sistema de conducción para lograr una arquitectura adecuada que permita un buen microclima y facilite las tareas culturales y de cosecha (Catania y Avagnina, 2010).

En el presente estudio, la arquitectura de la planta influyó significativamente en el porcentaje de aislamiento y en la variabilidad de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. La especie *Aspergillus carbonarius* se aisló en porcentajes mayores en los viñedos con sistema en parral y espaldera baja (19,5%, 16,5%, respectivamente), mientras que en los viñedos con espaldera alta dichos porcentajes fueron menores (2%). Las especies uniseriadas mostraron una frecuencia de aislamiento similar, mientras que las especies pertenecientes al agregado *A. niger* se aislaron en porcentajes mayores en los viñedos conducidos en espaldera alta (96%). Sin embargo, aunque en este sistema la incidencia de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* fue alta, el mayor porcentaje de cepas que fueron ocratoxigénicas se aislaron en el sistema en parral, representando el 17% del total de las cepas aisladas (Figura 26).

Estos resultados pueden ser explicados en base a las condiciones micro-climáticas a las que se encuentra expuesto el racimo en el período de maduración según la arquitectura de la planta (Vail y Marois, 1991; Pieri y col., 2001; Ferrer y col., 2008). Los sistemas en parrales presentan una superficie exterior superior al de los demás sistemas que está expuesta constantemente a la acción del sol, pero raramente el follaje presenta una buena extensión y crea por debajo del plano de vegetación un microclima por falta de ventilación muy favorable para el desarrollo de las enfermedades fúngicas (Hidalgo, 2003). Además, los racimos internos sombreados frente a los racimos expuestos, presentan temperaturas menores durante el día, ya que la radiación interceptada es menor. Sin embargo, durante la noche permanecen más calientes, debido a que las pérdidas de radiación neta son menores. Esto hace que la temperatura de las bayas de un racimo pueda variar desde los 2,4°C sobre la temperatura ambiente en racimos sombreados, hasta los 11 ó 12°C en bayas expuestas a radiación directa (Spayd y col., 2002). En cambio, en los viñedos conducidos en espaldera presentan mayor número de racimos expuestos y esta exposición diferencial de los racimos permite su mayor iluminación y ventilación, teniendo como consecuencia una

disminución en la diferencia de temperatura y humedad relativa entre la canopia y el ambiente a la vez que asegura una mayor penetración de productos fitosanitarios (Smart y Robinson, 1991; Egger, 1994; Ferrer y col., 2001, 2008).

Estas podrían ser algunas de las causas que expliquen la mayor incidencia de *A. carbonarius* y los *A. uniseriados* en parrales y de las especies pertenecientes al agregado *A. niger* en espaldero alto. El mayor aislamiento de *A. niger* en espaldero es probable que sea debido a su tasa de crecimiento más rápido y una mayor tolerancia a las temperaturas altas y a la actividad de agua baja (Battilani y col., 2003a; Leong y col., 2004; Serra y col., 2003, 2005; Bau y col., 2005; Bellí y col., 2005a). La mayor variabilidad de las especies también aisladas en espaldero bajo podría ser atribuido a que los racimos se encuentran más cerca del suelo. En estudios previos, se han demostrado que el movimiento del aire deposita esporas del suelo sobre la superficie de las bayas y la incidencia de las esporas de *A. carbonarius* se incrementa en las muestras de aire recolectadas en las zonas cercanas al suelo. El rol del movimiento de aire sobre la dispersión de las esporas del suelo fue claramente evidenciado por el aumento en la incidencia de *A. carbonarius* en bayas después de una tormenta de polvo severa (Battilani y col., 2004b; Kazi y col., 2004; Leong y col., 2006a).

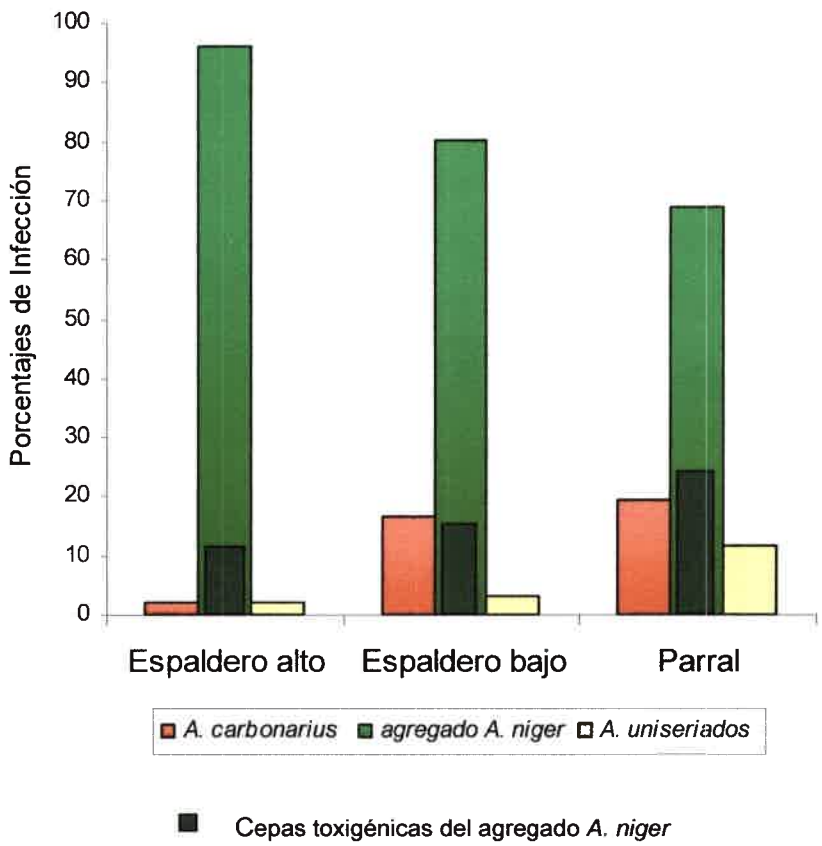


Figura 26. Diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* bajo los diferentes sistemas de conducción.

7.2 Tipo de suelo y sistema de riego.

En los viñedos, el suelo es la fuente primaria de inóculo de *Aspergillus* sección *Nigri*. Por lo tanto, las características físicas e hídricas del suelo podrían influir en la biodiversidad de las especies aisladas.

En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas entre la estructura del suelo (arenoso, arcilloso y limoso) y las especies de *Aspergillus* sección *Nirgi* aisladas de las uvas. Sin embargo, en los viñedos donde el riego fue realizado mediante el sistema de goteo se aislaron mayores porcentajes de *Aspergillus carbonarius* y *A.* uniseriados, representando el 13,5% y 11,5% del total de las cepas aisladas, respectivamente; mientras que, en los sistemas por gravedad los porcentajes fueron menores, 5,3% y 0,9%, respectivamente. La incidencia de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* fue alta en ambos sistemas de riego, pero el mayor porcentaje de cepas ocratoxigénicas se aislaron en los viñedos con el sistema por goteo (Figura 27).

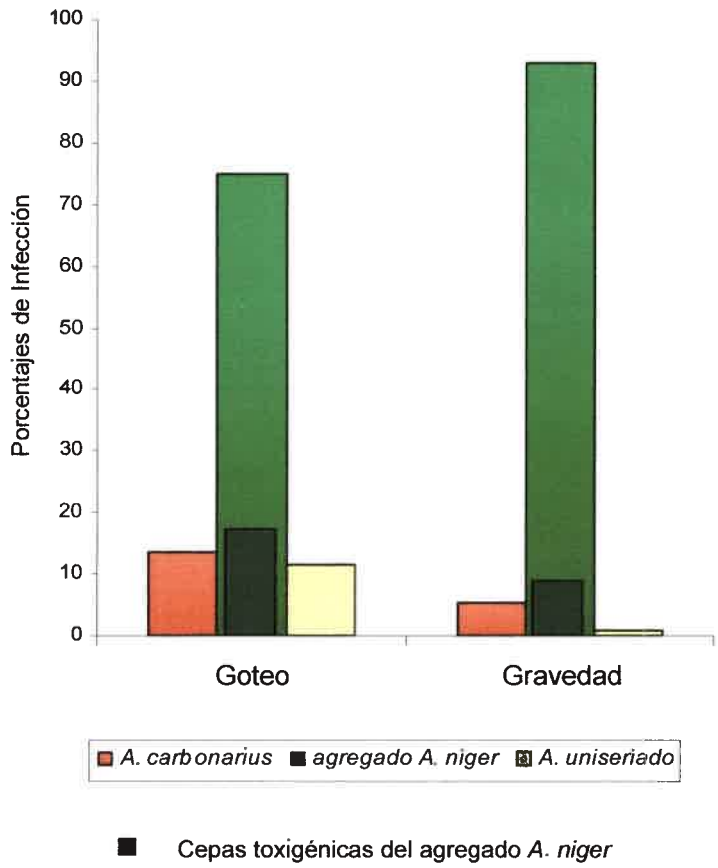


Figura 27. Diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* bajo los diferentes sistemas de riego.

En otros estudios, se ha observado que la incidencia de *A. carbonarius* es mayor en la superficie del suelo que en la profundidad, y que dicho aumento, es mayor debajo del suelo de las vides en que en el área entre las vides (surcos). El incremento en la incidencia de dichas poblaciones también se observó en los suelos regularmente removidos, con reducidos niveles de humedad y temperaturas cercanas a los 25°C. Particularmente, el efecto de la humedad fue más marcada en los suelos arcillosos en comparación con los suelos arenosos (Kazi y col., 2004, 2006; Leong y col., 2006b).

8. Incidencia natural de ocratoxina A en las muestras de uvas.

De las muestras de uvas analizadas en el estadío de cosecha, el 41% mostró niveles bajos de contaminación con OTA, que variaron entre 0,1 y 1,2 ng/gr (Tabla 14). Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con los obtenidos por Ponsone y col. (2007), quienes evaluaron la incidencia de OTA en muestras de uvas cultivadas bajo los sistemas de cultivo orgánico y convencional, en los viñedos localizados en la provincia de Mendoza. Aunque las muestras analizadas mostraron contaminación con especies productoras de OTA, las uvas no presentaron niveles detectables de la toxina. Similares resultados fueron obtenidos en viñedos de Portugal donde los porcentaje de las muestras de uvas contaminadas con OTA variaron entre el 35-50% durante los diferentes estadíos del cultivo, pero los niveles de contaminación detectados fueron bajos.

La correlación positiva obtenida entre los niveles de OTA en las uvas y las precipitaciones durante el estadio de cosecha ($r=0,47$, $p<0,0001$), indica que en los viñedos donde se registraron mayores precipitaciones se detectaron mayores niveles de contaminación con OTA. En Australia, Leong y col. (2004) observaron que la severidad de la infección por especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y la subsiguiente producción de OTA, era mayor en aquellos años donde las precipitaciones causaron daños en las uvas durante el estadío de cosecha en comparación con los periodos de sequía.

Por lo tanto, los niveles bajos de OTA en relación a la incidencia de las especies ocratoxigénicas, se podría explicar en base al buen estado sanitario de las uvas a cosecha evaluadas en el presente estudio, considerando que el muestreo fue al azar y no se seleccionó entre uvas dañadas y no dañadas. Sin embargo, la presencia de un porcentaje alto de especies productoras de OTA es relevante debido a que daños en las bayas podrían favorecer el incremento de la toxina en las muestras.

Los niveles de OTA en las uvas, se transfieren al vino durante la vinificación y pueden detectarse en otros subproductos, como jugo de uvas y pasas de uvas. Los niveles detectados en las uvas en las distintas regiones analizadas fueron menores al límite máximo

de OTA permitido en los vinos (2 µg/L), por lo que no resultaría un riesgo para la salud de los consumidores.

Tabla 14. Contaminación natural de ocratoxina A en uvas.

Regiones vitivinícolas	Ocratoxina A en uvas		
	Muestras positivas/total[1]	Rango (ng/gr)[2]	Media (ng/gr)[3]
La Rioja - Valle de Famatina	5/8	0,10 – 0,40	0,20
San Juan - Valle del Tulum	4/6	0,20 – 1,20	0,48
Mendoza Noreste	3/5	0,34 – 0,35	0,34
Mendoza - Valle de Uco	0/5	ND	-
Mendoza ZARM	2/5	0,12 – 0,27	0,20
Mendoza Sur	2/6	0,23 – 0,28	0,25
Río Negro - Neuquén	3/10	0,10 – 0,27	0,17

[1] N° de muestras contaminadas con OTA/total de muestras analizadas.
[2] Rango de los niveles de OTA detectados.
[3] Niveles medios de OTA detectados.
ND: niveles de OTA no detectados.
Límite de detección: 0,01 ng/gr.

8.1 Variedades de uvas.

En las variedades de uvas Bonarda, Syrah y Cabernet Sauvignon se aislaron los mayores porcentajes de *A. carbonarius,* representando el 29%, 12% y 10% de los aislamientos, respectivamente. Las cepas ocratoxigénicas pertenecientes al agregado *A. niger* se aislaron en altos porcentajes en la variedad Pinot Noir, Syrah y Cabernet Sauvignon. Las especies uniseriadas predominaron en la variedad Bonarda (Figura 28).

Con respeto a la contaminación con OTA, aunque los niveles detectados en las muestras de uva analizadas fueron bajos, en la variedad Cabernet Sauvignon se observaron los mayores niveles (media: 0,41 ng/gr).

Los resultados obtenidos demuestran que las variedades de uvas más compactas son más susceptibles a la infección por especies de *Aspergillus* sección *Nigri,* ya que en las variedades Malbec y Merlot que poseen racimos de estructura menos compacta, dichas especies se aislaron en bajos porcentajes. Los racimos compactos tienen mayor superficie de contacto entre las bayas, lo que produce, en esta zona, una menor deposición de cutícula y ceras epicuticulares, lo cual resulta más sensibles al ataque de las especies fúngicas (Vail y Marois, 1991). Además, en dichas zonas se mantiene una mayor humedad, lo que favorece la propagación de los focos de podredumbre. Los sistemas, como la lira, que mantienen ventilada dicha zona, muestran disminuciones de hasta 50% de daño por podredumbres (Ferrer y col., 2001, 2008; Pieri y col., 2001; Pertot y col., 2007). El tipo de

poda también influye sobre la compactación del racimo y, por lo tanto, en la infección fúngica de los mismos. La poda Royat es más predisponente a los ataques de podredumbre gris producida por *Botrytis* en comparación con la poda Guyot debido a que para una misma variedad, los racimos con poda Royat son más compactos que los racimos con poda Guyot (Phillips y col., 1990).

Otros autores en estudios *"in vitro"*, demostraron que la variedad de uva independientemente de la estructura del racimo, afectaba los niveles de contaminación con *Aspergillus* sección *Nigri* y el nivel de contaminación con OTA (Battilani y col., 2004a). Tres de las doce variedades evaluadas (Bianci di Alessano, Pampanuto y Uva di Troya), mostraron baja contaminación con OTA después de la infección superficial con 5 cepas productoras de la toxina, mientras que la variedad más susceptible, Cabernet Sauvignon, contenía niveles inferiores a 200 µg/kg de OTA y el 80% de las bayas colonizadas. Por otro lado, Leong (2005) observó que la variedad de uva no tenía un efecto directo sobre la incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* en las uvas no dañadas. Sin embargo, algunas variedades eran más susceptibles al daño y por lo tanto al deterioro por dichas especies.

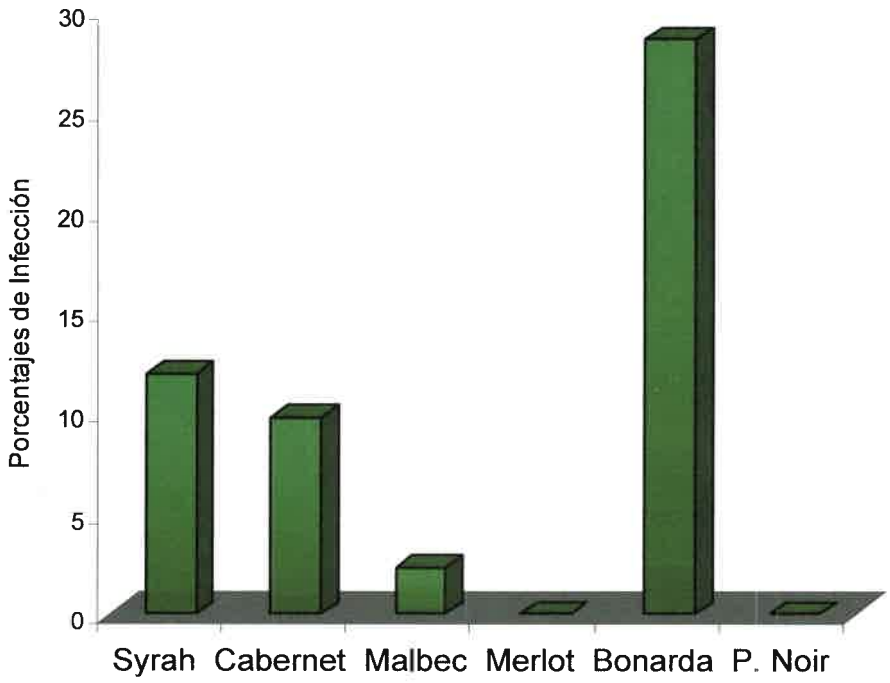


Figura 28. Incidencia de *Aspergillus carbonarius* en distintas variedades de uvas.

9. Incidencia natural de ocratoxina A en vinos.

Durante la vendimia 2007/08 se analizaron 76 muestras de vino vinificados a partir de las uvas tintas recolectadas en los viñedos estudiados, a fin de evaluar trazabilidad en la contaminación con OTA. En aquellos casos en los cuales no se pudieron conseguir muestras de vinos del mismo viñedo evaluado, se obtuvieron muestras de las bodegas de la zona.

En todos las regiones se aislaron a partir de las uvas especies productoras de ocratoxina A, pero sólo se observó contaminación natural con la toxina en el 8,5% de las muestras de vino analizadas. Los niveles detectados variaron entre 0,01 y 4,82 ng/mL y sólo en dos muestras obtenidas de Mendoza (noreste y sur) los niveles fueron superiores a 2 ng/mL. En un 46% de las muestras se detectaron niveles de OTA pero en el límite de detección de la técnica (0,01 ng/mL) (Tabla 15).

Aunque se ha demostrado que los niveles de OTA en los vinos tintos es mayor que en vinos rosados y blancos (Visconti y col., 2008), los vinos analizados en el presente estudio a pesar de ser vinos tintos presentaron niveles bajos de contaminación con OTA. En otros estudios realizados en Sudamérica los niveles de OTA detectados en vinos de Argentina, Chile y Brasil fueron mayores a los observados en el presente estudio y variaron entre 28,3 y 70,7 ng/mL (Chulze y col., 2006).

En un estudio realizado en Chile por Díaz y col. (2009) se observó que en los vinos tintos elaborados con un 0,5% de uvas infectadas con cepas toxigénicas de *A. carbonarius,* los niveles de OTA excedían el límite máximo permitido de contaminación establecido por la Comunidad Europea (2 µg/L). Apoyando dicho resultados, Cozi y col. (2006) señalo que todas las muestras de uvas en las cuales se detectó un nivel de OTA mayor a 1 ng/g estaban contaminadas con *Aspergillus* negros en una concentración de UFC>10^6. En el presente estudio, *A. carbonarius* fue aislado en porcentajes mayores, principalmente en las regiones de La Rioja y San Juan, sin embargo los niveles de OTA detectados fueron menores a los esperados. Dichos resultados podrían explicarse en base a que las condiciones ambientales no fueron favorables para la producción de la toxina o que durante el proceso de vinificación ocurrió una reducción en el contenido de OTA, como fue demostrado previamente por Ponsone y col. (2007).

Tabla 15. Contaminación natural de ocratoxina A en vinos. Vendimia 2007/08.

Regiones	Viñedos	Variedades	Niveles de OTA (ng/mL)
La Rioja (Valle de Famatina)	1	Bonarda	LD
	2	Syrah	0,01 – 2,00
	3	Cabernet Sauvignon	LD
	4	Malbec	LD
	5	Syrah	LD
San Juan (Valle del Tulum)	6	Syrah	-
	7	Syrah	-
	8	Cabernet Sauvignon	-
	9	Merlot	-
	10	Syrah	LD
	11	Cabernet Sauvignon	LD
Mendoza ZARM	12	Cabernet Sauvignon	LD
	13	Malbec	-
	14	Syrah	-
	15	Malbec	-
	16	Cabernet Sauvignon	-
	17	Malbec	-
	18	Cabernet Sauvignon	-
	19	Malbec	-
Mendoza Valle de Uco	20	Malbec/Merlot	-
	21	Malbec	-
	22	Syrah	-
	23	Malbec	-
	24	Malbec	-
	25	Malbec	-
	26	Merlot	-
	27	Malbec	LD
	28	Merlot	LD
	29	Malbec	LD
	30	Cabernet Sauvignon	-
Mendoza Noreste	31	Merlot	-
	32	Syrah	-
	33	Bonarda	-
	34	Syrah	LD
	35	Syrah	-
Mendoza Sur	36	Cabernet Sauvignon	-
	37	Merlot	LD
	38	Malbec	0.01 - 4.82
	39	Cabernet Sauvignon	LD
	40	Merlot	-
	41	Cabernet Sauvignon	-
Neuquén – Río Negro	42	Malbec	LD
	43	Cabernet Sauvignon	-
	44	Malbec	-

LD: límite de detección de la técnica, 0,01 ng/mL.

10. Efecto de *Planococcus ficus* sobre la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de ocratoxina A en uvas.

10.1 Micoflora aislada de uvas.

Durante las vendimias 2006/07 y 2008/9, se observó la infestación de las uvas con *Planococcus ficus* en los viñedos de la región de Mendoza (25% de los viñedos). Los diferentes niveles de contaminación fúngica fueron influenciados por el año de vendimia, la variedad y estado (uva intacta y uva dañada por *P. ficus*) de uva. En los viñedos evaluados durante la vendimia 2006/07, la incidencia del género *Alternaria* fue mayor en todas las variedades de uvas, independiente del estado en que se recolectó el racimo. Sin embargo, los porcentajes de infección fueron mayores en uvas dañadas y variaron entre 45,8% y 91,6% (media: 69,8%); mientras que, en uvas intactas variaron entre 21,4% y 79,6% (media 53,7%). *Aspergillus, Penicillium* y la levadura también se aislaron con frecuencia y en mayores niveles en uvas dañadas. *Cladosporium*, *Fusarium* y *Trichoderma* se aislaron en porcentajes menores al 10% (Figura 29). Durante la vendimia 2008/09, se observaron mayores niveles de contaminación con levaduras, alcanzando un 99% de infección en la variedad Cabernet Sauvignon. Los niveles de infección con especies de *Alternaria* y *Aspergillus* solo fueron relevantes en la variedad Malbec (56% y 57,6% de las muestras, respectivamente) (Figura 30).

El análisis de la varianza demostró diferencias significativas ($p<0,05$; $p>0,001$), entre las bayas intactas y dañadas, con los mayores porcentajes de infección observados en las bayas dañadas.

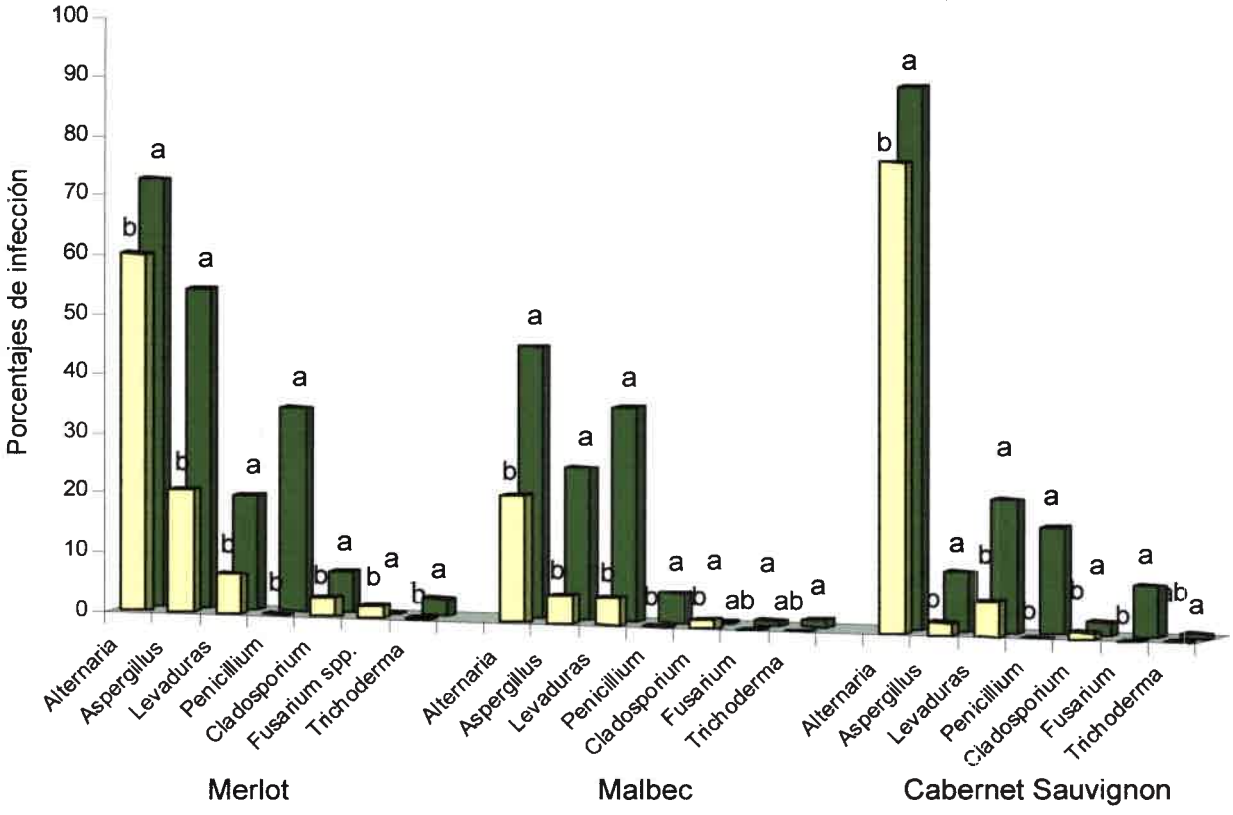


Figura 29. Micoflora aislada de uvas intactas y dañadas por *Planococcus ficus* durante la vendimia 2006/07. Las letras ubicadas sobre las barras indican diferencias significativa en los porcentajes de infección de la micoflora entre uvas dañadas e intactas ($p<0,001$; $p<0,05$). Uvas dañadas (■) y uvas intactas (■).

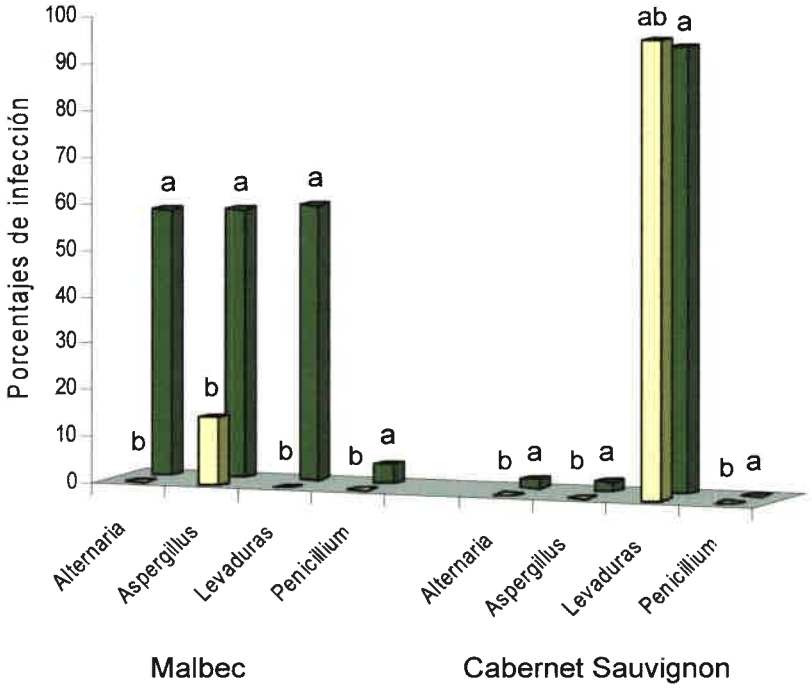


Figura 30. Micoflora aislada de uvas intactas y dañadas por *Planococcus ficus* durante la vendimia 2008/09. Las letras ubicadas sobre las barras indican diferencias significativa en los porcentajes de infección de la micoflora entre uvas dañadas e intactas ($p<0,001$; $p<0,05$). Uvas dañadas (■) y uvas intactas (■).

Los géneros *Alternaria* y *Aspergillus* fueron aislados con mayor frecuencia durante ambas vendimias. Los resultados concuerdan con un estudio realizado por Magnoli y col. (2003), quienes evaluaron la micoflora y las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* en muestras de uvas cosechadas en la misma zona agroecológica. *Alternaria alternata* fue la especie dominante aislada en un 80% de las muestras, mientras que las especies pertenecientes a *Aspergillus* fueron aisladas en un 70% de las mismas.

La predominancia de *Alternaria* podría influenciar la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de OTA detectados en las uvas. Se ha demostrado las diferentes capacidades de degradación de OTA por las especies frecuentemente aisladas de uvas como *Alternaria, Botrytis, Cladosporium* y *Penicillium* (Abrunhosa y col., 2002). En adición, Varga y col. (2005) demostraron la habilidad de diversas especies pertenecientes a los géneros *Rhizopus* y *Mucor* para degradar ocratoxina A y observaron que las cepas de *Rhizopus* eran capaces de degradar más del 95% de la toxina.

Durante la vendimia 2008/09, altos porcentajes de levaduras fueron observados en las muestras de uvas dañadas e intactas, en ambas variedades evaluadas. Estos resultados podrían explicar la menor incidencia de especies filamentosas aisladas durante esta vendimia. Es importante destacar la presencia de levaduras, ya que en estudios sobre mecanismos de antagonismo basados en la competición por espacio y por nutrientes, se ha demostrado que las levaduras pueden ser utilizadas como agentes potenciales de control biológico en uvas contra cepas ocratoxigénicas de *Aspergillus*. Bleve y col. (2006) demostraron que *Cryptococcus lauentii* y *Aureobasidium pullulans* fueron las especies de levaduras más competentes. En viñedos de Argentina, también se aisló la levadura *Kluyveromyces thermotolerants* con habilidad de inhibir el crecimiento de *Aspergillus* sección *Nigri* y la producción de OTA (Ponsone y col., 2011).

10.2 Incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri*.

El análisis de la micoflora potencialmente ocratoxigénica demostró que del total de muestras analizadas durante ambas vendimias, el 94% de las especies de *Aspergillus* aisladas se identificaron dentro de *Aspergillus* sección *Nigri*. La frecuencia de contaminación de las muestras de uvas varió del 70 al 100% durante la vendimia 2006/07, mientras que durante la vendimia 2008/09 sólo alcanzó el 50% de infección. Independientemente de la variedad y del año evaluado, las bayas infectadas por *Planococcus ficus* presentaron los mayores niveles de contaminación con *Aspergillus* sección *Nigri* ($p < 0.05$) ($p<0,001$) (Anexo II, Tablas 22 y 23).

En el periodo 2006/07, Merlot fue la variedad que presentó mayores niveles de contaminación tanto en las bayas dañadas como en las intactas, representando el 53,5% y

20%, respectivamente; mientras que durante el periodo 2008/09, la variedad Malbec presentó la mayor incidencia de contaminación con el 57,6% y 14% en uvas dañadas e intactas, respectivamente (Figura 31).

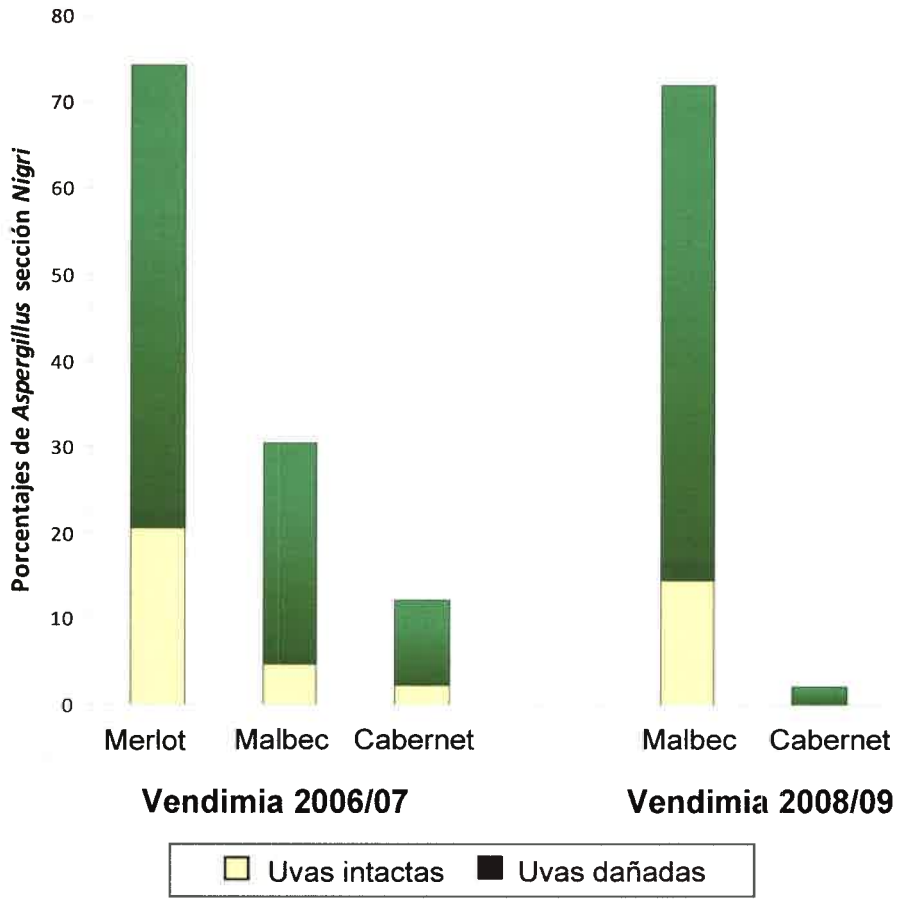


Figura 31. Porcentaje de bayas colonizadas por *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas infectadas por *P. ficus* e intactas.

Se demostró que la infestación de las uvas por *Planococcus ficus* afecta la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri*. La presencia del insecto alteraría la integridad de las bayas mientras se alimenta activamente, favoreciendo el deterioro por las especies de *Aspergillus* y consecuentemente, la producción de OTA. Además, secreta sustancias azucaradas que cubren las hojas y los frutos, las cuales servirían como sustrato para diversas especies de hormigas. En nuestro estudio, se recolectaron las hormigas ubicadas sobre las plantas infectadas con *P. ficus* y se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo DRBC. A los 7 días de incubación, se observó el crecimiento de *Aspergillus* sección *Nigri*, lo cual demostró que las hormigas podrían ser una fuente de diseminación de *Aspergillus* negros en uvas (Figura 32). Diversos estudios, muestran que los insectos tendrían una relación simbiótica con los hongos, facilitando su rápida penetración y el desarrollo del micelio sobre las bayas de las uvas infectadas (Fernnaud y Le Menn, 1989, 1992).

Figura 32. Huellas de inóculo diseminado en medio de cultivo DRBC por hormigas recolectadas de los racimos de uvas infectados por *Planococcus ficus*.

10. 3 Ocratoxina A en uvas dañadas e intactas por *P. ficus*.

El 27% de las muestras de uvas analizadas mostraron contaminación con ocratoxina A, en niveles que variaron entre 0,1 y 140,2 ng/g (Tabla 16). La concentración media de OTA en uvas infectadas fue significativamente mayor en comparación con las muestras intactas ($P<0,001$). En la vendimia 2006/07, sólo en las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon se detectaron niveles de OTA, en concentraciones que variaron desde 0,1 a 140,2 ng/g. En la vendimia 2008/09, en las dos variedades analizadas se detectaron niveles de toxina pero en niveles más bajos, desde 0,7 a 11,8 ng/g. Las muestras de la variedad Cabernet Sauvignon presentaron los mayores niveles de contaminación en ambos años evaluados (niveles medios: 50,1 ng/g y 8,6 ng/g in las vendimias 2006/07 y el 2008/09, respectivamente).

En las bayas de uvas dañadas por *Planococcus ficus* se detectaron mayores niveles de contaminación con OTA. Los resultados concuerdan con un estudio previo, en el cual se analizó el daño producido por otro insecto (*Lobesia botrana)* en los viñedos localizados en el sur de Italia (Cozzi y col., 2006). Este insecto facilita la rápida penetración fúngica en las uvas, ya sea produciendo un daños mecánico sobre las bayas o actuando como vector en la diseminación de las esporas sobre su cutícula. Este proceso de infección también fue demostrado para *Botrytis* cinerea (Fermaud y col., 1989; Cozzi y col., 2006).

Los resultados confirman la importancia del daño producido en las bayas por *P. ficus* como un factor de riesgo para el incremento de la incidencia de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y la contaminación con ocratoxina A en los viñedos. Por lo tanto, la implementación de medidas preventivas para minimizar daños en las bayas por insectos durante las diferentes etapas de desarrollo de las uvas podría reducir significativamente los niveles de contaminación con OTA.

Tabla 16. Niveles de ocratoxina A en uvas intactas y dañadas.

Año	Variedades de uvas	Categoría	Incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri*		Ocurrencia de OTA		
			Rango (%)[1]	Frecuencia (%)[3]	Muestras positivas/total	Rango (ng/g)	Media (ng/g)
2006/07	Merlot	Intactas	6 - 70	100	5/10	0,5 – 15,6	7,2a
		Dañadas	2 - 78	100	7/10	1,3 – 50,2	15,3b
	Malbec	Intactas	2 - 14	80	0/10	ND	-
		Dañadas	2 - 88	90	0/10	ND	-
	Cabernet Sauvignon	Intactas	4 - 70	90	1/10	0.1	0,1a
		Dañadas	2 - 80	70	9/10	2,7 – 140,2	51,2b
2008/09	Malbec	Intactas	0 – 25	50	0/10	ND	-
		Dañadas	4 - 70	20	3/10	0,1 – 1,0	0,6
	Cabernet Sauvignon	Intactas	ND	0	1/10	5,4	5,4a
		Dañadas	0 - 20	10	7/10	0,1 – 11,8	8,6b

[1] Rango de infección de *Aspergillus* sección *Nigri* obtenido entre diez muestras analizadas por categoría.
[2] Frecuencia de aislamiento: numero de muestras infectadas del total de muestras analizadas por viñedo.
[3] N° de cepas productoras de OTA/total de cepas aisladas.
[4] Rango de los niveles de OTA detectados.
[5] Niveles medios de OTA detectados.
ND: niveles de OTA no detectados. Límite de detección: 0,05 ng/g.
Diferencias significativas: P<0,001.

SECCIÓN II

Caracterización molecular de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*

1. Análisis por polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados ($AFLP_s$)

En el presente estudio se utilizaron marcadores moleculares generados por $AFLP_s$ para determinar la variación genética entre 146 cepas de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri* con potencial para producir ocratoxina A. La mayoría de las cepas fueron identificadas morfológicamente como pertenecientes al "agregado" *A. niger* (75 % de las cepas), seguido por *A. carbonarius* (21 % de las cepas) y *Aspergillus* "uniseriados" (4 % de las cepas).

Para determinar la variación genética, los geles de poliacrilamida fueron analizados excluyendo aquellos fragmentos de ADN mayores a 400 pb y menores de 100 pb aproximadamente. La comparación visual del patrón de bandas generados por AFLP permitió distinguir bandas específicas de género, bandas específicas de especie (monomórficas) y la presencia de bandas polimórficas (Figura 33).

Uno de los factores más importantes en la amplificación de un buen número de fragmentos de restricción en una reacción de AFLP, esta dado por el número de nucleótidos selectivos en los cebadores de amplificación (Vos y col., 1995). En el presente estudio se comenzó a trabajar utilizando 3 combinaciones de cebadores, los cuales contenían 1 y 2 nucleótidos selectivos (*Eco*RI + AC / *Mse*I + CC; *Eco*RI + AC / *Mse*I + CA; *Eco*RI + G / *Mse*I + CT; *Eco*RI + AT / *Mse*I + CG). El resultado fue la obtención de un número escaso de bandas que no podían ser utilizadas para evaluar polimorfismos, lo cual indicaba una deficiencia en la combinación de cebadores utilizada, excepto para la combinación *Eco*RI + AT / *Mse*I + CG. Se decidio por tal motivo utilizar otra combinación de cebadores (*Eco*RI + TG / *Mse*I + CG), mediante la cual se logró un número considerable de fragmentos amplificados.

De las 5 combinaciones de cebadores selectivos utilizados, 2 de ellas amplificaron un número de bandas conveniente a fin de poder realizar análisis posteriores (*Eco*RI + TG / *Mse*I + CG y *Eco*RI + AT / *Mse*I + CG). La combinación de cebadores *Eco*RI + TG / *Mse*I + CG amplificó 55 fragmentos de los cuales 51 (93 %) presentaron sitios polimórficos. Con la combinación de cebador *Eco*RI + AT / *Mse*I + CG se obtuvieron 52 bandas, 46 de las cuales fueron polimórficas (88 %).

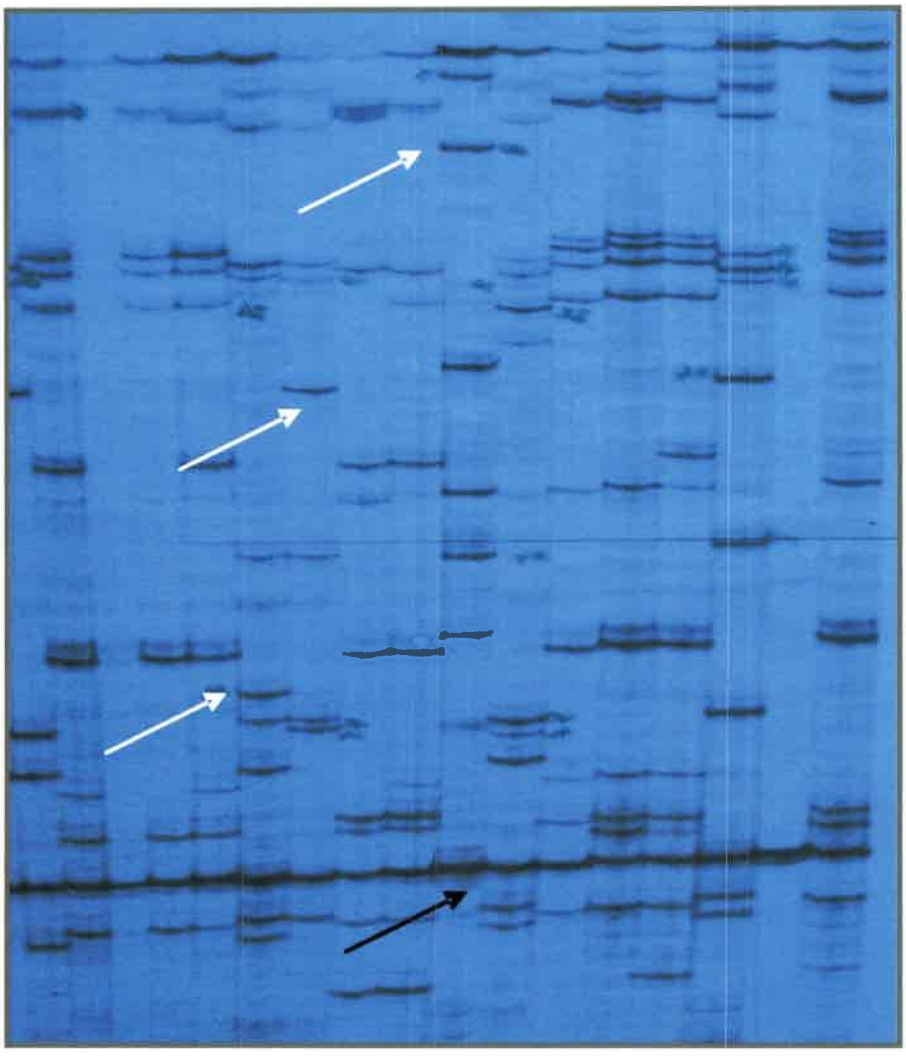


Figura 33. Gel de poliacrilamida obtenido de la combinación TG/CG. (↗) Bandas monomórficas y (↗) polimórficas.

A partir de los perfiles de las 107 bandas de ADN amplificadas con las dos combinaciones de cebadores se construyó una matriz binaria para las 88 cepas aisladas durante las vendimias 2006/07 y 2007/08 (107 fragmentos x 88 cepas) y una matriz binaria para las 58 cepas aisladas durante la vendimia 2009/10 (107 fragmentos x 58 cepas), que fueron analizadas y utilizadas para construir dendrogramas, en base a los análisis de las medias aritméticas UPGMA (Figuras 34 y 35). Los dendrogramas resultantes permitieron la comparación entre los haplotipos y permitieron una separación clara en cuatro clados o grupos: *A. carbonarius, A. tubingensis,* el "agregado" *A. niger* y *Aspergillus* "uniseriados". Las cepas fueron asignadas a una especie si compartían más del 50% de las bandas con la cepa de referencia.

Del total de las cepas analizadas, 30 pertenecieron al clado *A. carbonarius*, 78 al clado *A. tubingensis*, 22 al clado "agregado" *A. niger* y 6 al clado *Aspergillus* "uniseriados". En el dendograma 1 (Figura 34) diez cepas no pudieron ser asignadas a ninguno de los

grupos, de acuerdo a la ubicación de las cepas de referencia. Sin embargo, estas cepas se agruparon mostrando una mayor similitud con la cepa de referencia *A. tubingensis* (45%) y fueron consideradas como *A. tubingensis* "atípicas" o pertenecientes a una especie estrechamente relacionada. La descripción de los cuatro clados identificados se detalla a continuación:

***Aspergillus* "uniseriados".** Este clado sólo se obtuvo en el dendrograma 1, ya que durante la vendimia 2009/10 no se aislaron cepas de *Aspergillus* uniseriadas. El clado mostró una baja homología (42%) y una alta heterogeneidad interna. Cinco cepas se agruparon con *A. japonicus* ITEM 7034, 3 con una similitud del 37% y, en particular, la cepa ASNRC 84, con una similitud del 52%. Dos cepas fueron agrupadas con *A. aculeatus* ITEM 7046 con una similitud del 61%. Ninguna de las cepas evaluadas produjo niveles detectables de OTA.

***Aspergillus tubingensis*.** En este clado se agruparon el mayor número de cepas (n=38 y n=21) mostrando un 68% y 59% de similitud con *A. tubingensis* FRR 5720 en los dendrogramas 1 y 2 (Figura 35), respectivamente. En el dendrograma 1, seis cepas formaron otras ramas, tres no se agruparon con otras cepas y el resto formaron un grupo más pequeño con un 60% de similitud entre ellas. En el dendrograma 2, también se formaron 3 subgrupos con porcentajes de similitud que variaron entre 53% y 71%. Las cepas incluidas en este grupo no fueron previamente identificados como *A. tubingensis* según criterios morfológicos. Dieciocho de las 80 cepas incluidas en este grupo produjeron niveles detectables de OTA.

***Aspergillus carbonarius*.** El clado incluyó 16 y 14 cepas identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* durante las vendimia 2006/07-2007/08 y 2009/10, respectivamente. Todas las cepas se agruparon con una similitud del 81% y 90% con *A. carbonarius* FRR 569, mientras que entre ellos compartieron el 90% y 91% de las bandas en el dendrograma 1 y 2 respectivamente. En particular, seis cepas en el dendograma 1 se agruparon con la cepa de referencia con un 100% de homología. Todas las cepas fueron productoras de OTA y los niveles de producción variables.

"agregado" *Aspergillus niger*. Este grupo mostró una alta heterogeneidad. En el dendograma 1 doce cepas se agruparon con una similitud del 42 al 90% con *A. niger* FRR 5722 y del 36 al 82% con *A. awamori* FRR 5804. En el dendograma 2, las cepas de referencia agruparon con una similitud del 48% con las cepas de referencia *A. niger* ITEM 4501, FRR 5695, FRR 5722 y *A. awamori* ITEM 4502, ITEM 4509. El clado es considerado como " agregado" *A. niger*, ya que no se observó una homología distintiva con ninguna de

los dos cepas de referencia mencionadas previamente. Todas las cepas analizadas fueron morfológicamente indistinguible de las cepas incluidas en el grupo *A. tubingensis*. Tres de las 22 cepas de este grupo produjeron niveles detectables de OTA.

Los resultados obtenidos mediante el análisis por AFLP demostraron que las poblaciones de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri* fueron heterogéneas y estuvieron representadas principalmente por cuatro grupos bien definidos: *A. carbonarius, A. tubingensis,* "agregado" *A. niger* y *Aspergillus* "uniseridos". Perrone y col. (2006b) analizaron por AFLP 283 cepas de *Aspergillus* negros aisladas de diferentes viñedos europeos y, separaron claramente estas poblaciones. Tres grupos presentaron una homología intraespecífica mayor al 48%, *A. carbonarius, A. tubingensis* y *Aspergillus* "uniseridos" (con una similaridad menor al 20% con la cepa de referencia *A. japonicus*), mientras que el agregado" *A. niger* mostró una alta heterogeneidad interna y baja homología con la cepa de referencia *A. niger*.

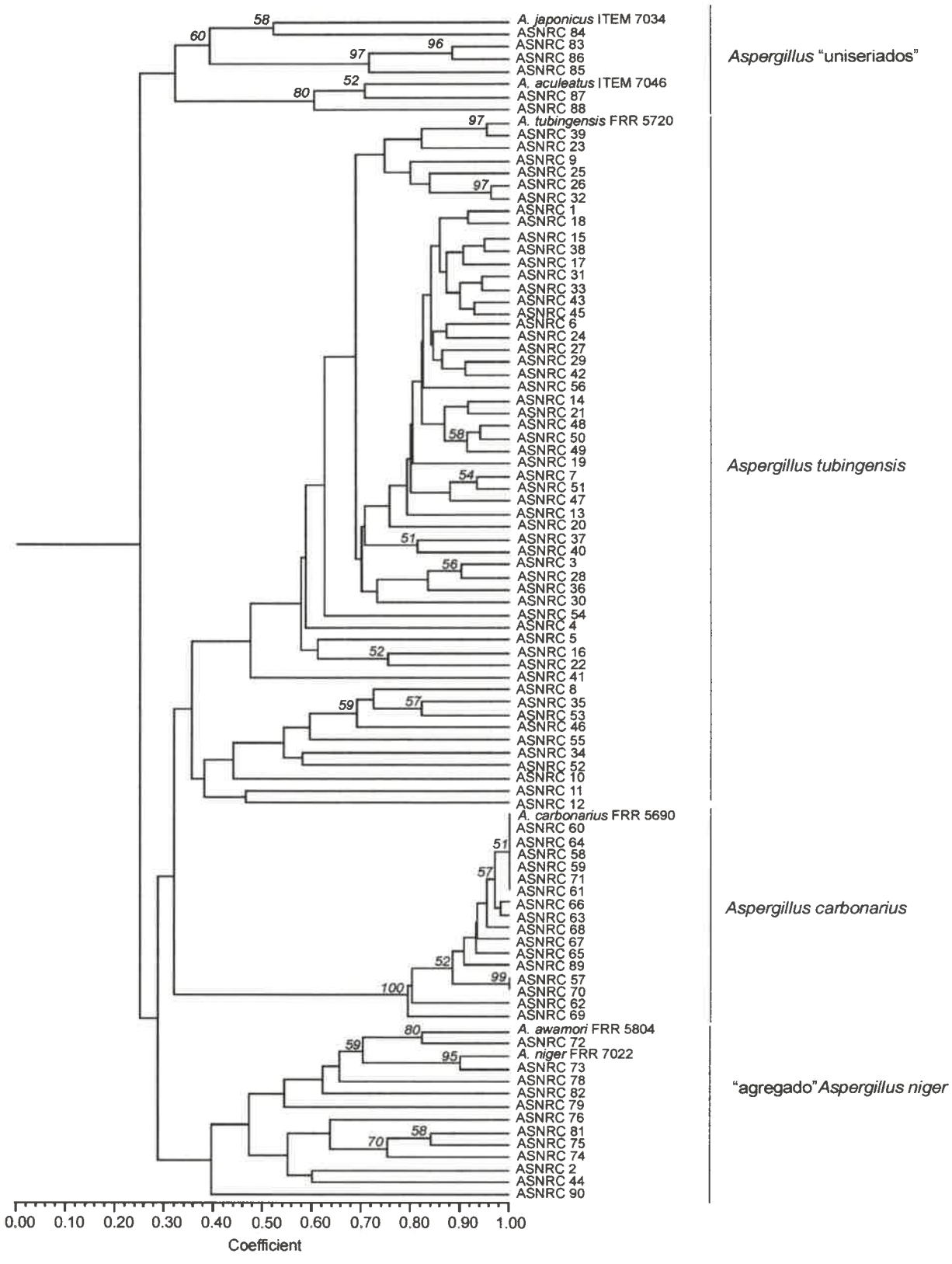


Figura 34. Dendrograma obtenido por AFLP evidenciando la biodiversidad molecular de cepas representativas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de Argentina durante las vendimias 2006/07 y 2007/08. Los números sobre las ramas indican el porcentaje de réplica en los cuales los taxones asociados se agrupan juntos (bootstrap= 1000 replicas).

Tabla 17. Origen y producción de ocratoxina A por las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis.

Cepa	Especie	Origen	OTA	Año
ASNRC 84	*A.* "uniseriate"	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 83	*A.* "uniseriate"	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 86	*A.* "uniseriate"	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 85	*A.* "uniseriate"	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 87	*A.* "uniseriate"	Mendoza - ZARM	nd	2006/07
ASNRC 88	*A.* "uniseriate"	Mendoza - ZARM	nd	2006/07
ASNRC 39	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2006/07
ASNRC 23	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 9	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 25	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 26	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 32	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2007/08
ASNRC 1	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2006/07
ASNRC 18	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	2007/08
ASNRC 15	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	+	2006/07
ASNRC 38	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2006/07
ASNRC 17	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2006/07
ASNRC 31	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2006/07
ASNRC 33	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	+	2006/07
ASNRC 43	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	LD	2007/08
ASNRC 45	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2007/08
ASNRC 6	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2007/08
ASNRC 24	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 27	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 29	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2006/07
ASNRC 42	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2007/08
ASNRC 56	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	+	2007/08
ASNRC 14	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 21	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 48	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2006/07
ASNRC 50	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2006/07
ASNRC 49	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	+	2006/07
ASNRC 19	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	+	2006/07
ASNRC 7	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2007/08
ASNRC 51	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2006/07
ASNRC 47	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 13	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 20	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2007/08
ASNRC 37	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 40	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2007/08
ASNRC 3	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	+	2006/07
ASNRC 28	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	nd	2006/07
ASNRC 36	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 30	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	+	2006/07
ASNRC 54	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2007/08
ASNRC 4	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	+	2007/08
ASNRC 5	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2007/08
ASNRC 16	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	+	2006/07
ASNRC 22	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	+	2006/07
ASNRC 41	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2007/08
ASNRC 8	*A. tubingensis* "atípica"	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07

Continuación de la Tabla 17.

Cepa	Especie	Origen	OTA	Año
ASNRC 35	*A. tubingensis* "atípica"	San Juan - Valle del Tulum	nd	2006/07
ASNRC 53	*A. tubingensis* "atípica"	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 46	*A. tubingensis* "atípica"	San Juan - Valle del Tulum	+	2006/07
ASNRC 55	*A. tubingensis* "atípica"	San Juan - Valle del Tulum	nd	2007/08
ASNRC 34	*A. tubingensis* "atípica"	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 52	*A. tubingensis* "atípica"	San Juan - Valle del Tulum	+	2006/07
ASNRC 10	*A. tubingensis* "atípica"	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 11	*A. tubingensis* "atípica"	La Rioja - Chilecito	nd	2006/07
ASNRC 12	*A. tubingensis* "atípica"	La Rioja - Chilecito	nd	2007/08
ASNRC 60	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	+	2007/08
ASNRC 64	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2006/07
ASNRC 58	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	++	2006/07
ASNRC 59	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	++	2006/07
ASNRC 71	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2007/08
ASNRC 89	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	+	2007/08
ASNRC 66	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+++	2006/07
ASNRC 63	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	++++	2007/08
ASNRC 68	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+++	2007/08
ASNRC 67	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2006/07
ASNRC 65	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2006/07
ASNRC 89	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2006/07
ASNRC 57	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	+++	2006/07
ASNRC 70	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2007/08
ASNRC 62	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	++++	2007/08
ASNRC 69	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2007/08
ASNRC 72	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - ZARM	+	2006/07
ASNRC 73	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - ZARM	nd	2006/07
ASNRC 78	*A. niger* "aggregate"	Neuquén - Río Negro	nd	2007/08
ASNRC 82	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - Uco Valley	nd	2007/08
ASNRC 79	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - Noreste	nd	2006/07
ASNRC 76	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - ZARM	nd	2007/08
ASNRC 81	*A. niger* "aggregate"	Mendoza – Valle de Uco	nd	2007/08
ASNRC 75	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - ZARM	nd	2006/07
ASNRC 74	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - ZARM	nd	2006/07
ASNRC 2	*A. niger* "aggregate"	Mendoza - ZARM	nd	2007/08
ASNRC 44	*A. niger* "aggregate"	Neuquén - Río negro	nd	2007/08
ASNRC 90	*A. niger* "aggregate"	San Juan - Valle del Tulum	+	2006/07

Cepas de referencia:

FRR 7022	*Aspergillus niger*
FRR 5804	*Aspergillus awamori*
FRR 5720	*Aspergillus tubingensis*
FRR 5690	*Aspergillus carbonarius*
ITEM 7034	*Aspergillus japonicus*
ITEM 7046	*Aspergillus aculeatus*

nd: niveles de OTA no detectados. Límite de detección: 0,05 ng/gr.

Niveles de OTA: + <100; ++ 100 – 1000; +++ 1000 – 5000; ++++ > 5000 ng/gr.

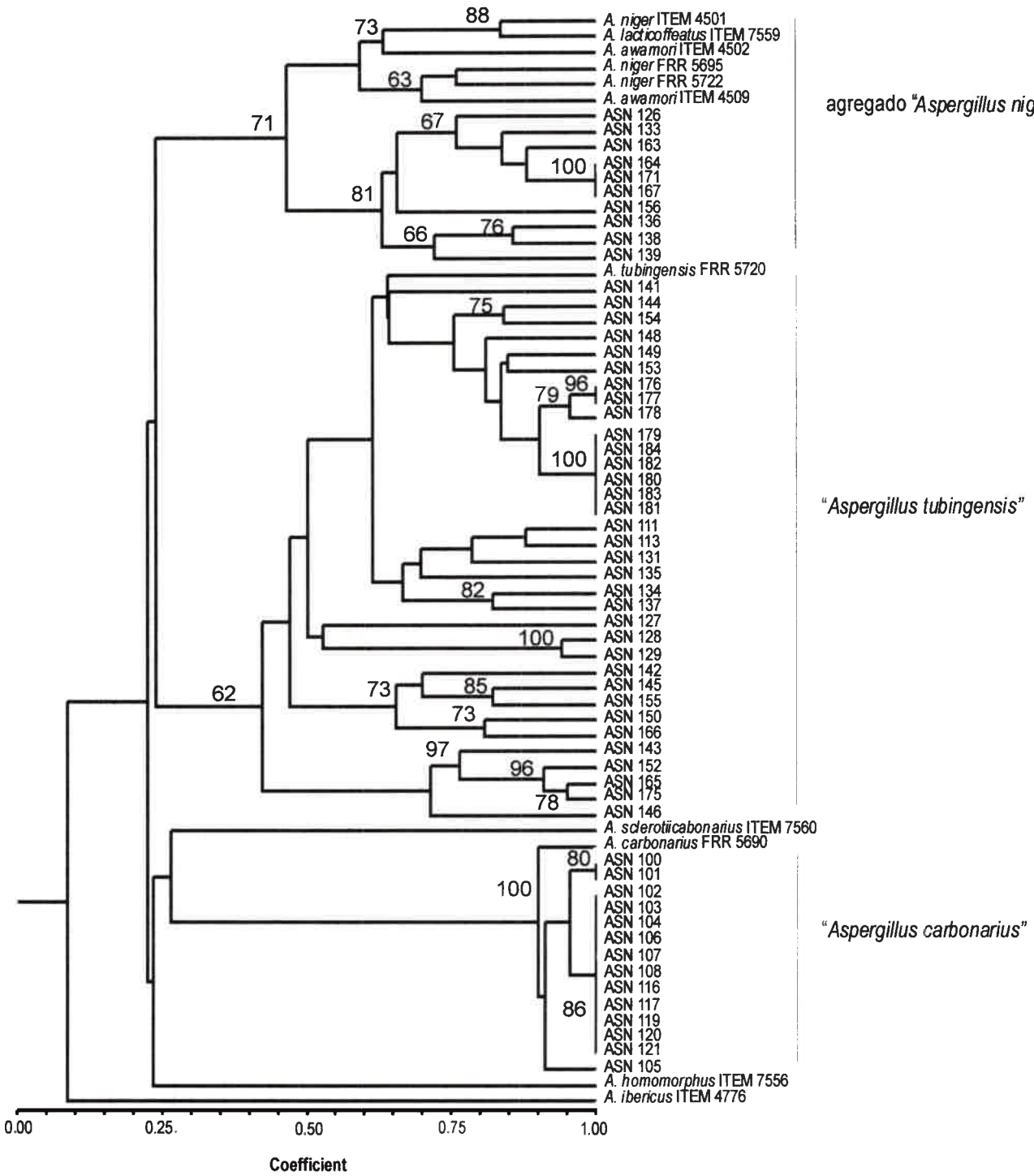


Figura 35. Dendrograma obtenido por AFLP evidenciando la bio diversidad molecular de cepas representativas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de Argentina durante la vendimia 2009/10. Los números sobre las ramas indican el porcentaje de réplica en los cuales los taxones asociados se agrupan juntos (bootstrap= 1000 replicas).

Tabla 18. Origen y producción de ocratoxina A por las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis.

Cepa	Especie	Origen	OTA	Año
ASNRC 126	agregado *A. niger*	La Rioja - Chilecito	+	2009/10
ASNRC 133	agregado *A. niger*	Mendoza - Noreste	nd	2009/10
ASNRC 163	agregado *A. niger*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 164	agregado *A. niger*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 171	agregado *A. niger*	Mendoza - Sur	+	2009/10
ASNRC 167	agregado *A. niger*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 156	agregado *A. niger*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 136	agregado *A. niger*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 138	agregado *A. niger*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 139	agregado *A. niger*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 141	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 144	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 154	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 148	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	2009/10
ASNRC 149	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	2009/10
ASNRC 153	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 176	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 177	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 178	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 179	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 184	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 182	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 180	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 183	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 181	*A. tubingensis*	Neuquén - Río negro	nd	2009/10
ASNRC 111	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2009/10
ASNRC 113	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2009/10
ASNRC 131	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2009/10
ASNRC 135	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 134	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	2009/10
ASNRC 137	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	+	2009/10
ASNRC 127	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	+	2009/10
ASNRC 128	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	+	2009/10
ASNRC 129	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	2009/10
ASNRC 142	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 145	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	2009/10
ASNRC 155	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 150	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	2009/10
ASNRC 166	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 143	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	2009/10
ASNRC 152	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 165	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	2009/10
ASNRC 175	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	nd	2009/10
ASNRC 146	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	2009/10
ASNRC 100	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2009/10
ASNRC 101	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2009/10
ASNRC 102	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2009/10
ASNRC 103	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2009/10
ASNRC 104	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2009/10
ASNRC 106	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2009/10
ASNRC 107	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2009/10

Continuación de la Tabla 18.

Cepa	Especie	Origen	OTA	Año
ASNRC 108	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	+	2006/07
ASNRC 116	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	+	2007/08
ASNRC 117	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	+	2006/07
ASNRC 119	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	++	2007/08
ASNRC 120	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	+	2007/08
ASNRC 121	*A. carbonarius*	San Juan - Valle del Tulum	++	2006/07
ASNRC 105	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	2006/07
Cepas de referencia:				
ITEM 4501	*Aspergillus niger*			
ITEM 7559	*Aspergillus lacticoffeatus*			
ITEM 4502	*Aspergillus awamori*			
FRR 5695	*Aspergillus niger*			
FRR 5722	*Aspergillus niger*			
ITEM 4509	*Aspergillus awamori*			
FRR 5720	*Aspergillus tubingensis*			
ITEM 7560	*Aspergillus sclerotiicarbonarius*			
FRR 5690	*Aspergillus carbonarius*			
ITEM 7556	*Aspergillus homomorphus*			
ITEM 4776	*Aspergillus ibericus*			

1.2 Análisis filogenético basado sobre las secuencias de los genes de la calmodulina, β-tubulina, el factor de elongación 1α y la subunidad de la ARN polimerasa II.

La caracterización filogenética de 99 cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de distintas regiones vitivinícolas de Argentina se realizó mediante el secuenciamiento de 4 genes codificantes de proteínas, la calmodulina (*caM*), la β-tubulina (*benA*), el factor de elongación 1α (*ef-1α*) y la subunidad de la ARN polimerasa II (*rpb2*).

Los cebadores utilizados fueron capaces de amplificar (Figuras 36, 37, 38 y 39) y secuenciar aproximadamente 536 (*caM*), 430 (*benA*), 694 (*ef-1α*) y 1083 pb (*rpb2*). Considerando los 2743 nucleótidos secuenciados, el 32,2% fueron caracteres variables y el 28,1% parsimoniamente informativos para las diferentes cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* analizadas. El número más bajo de sitios/caracteres informativos fue de 101 en la región amplificada del gen *ef-1α*, mientras que el más alto de 268 en la región del gen de la *rpb2*.

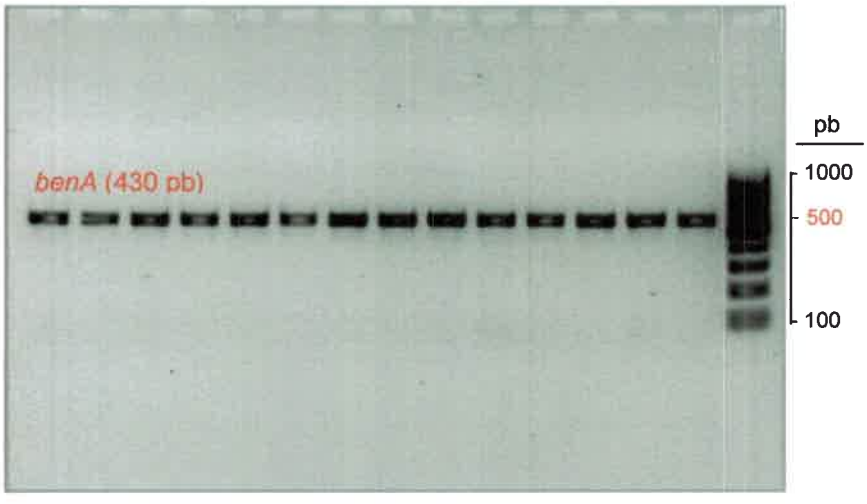


Figura 36. Amplificación del gen de la β-tubulina (*benA*) en un gel de agarosa al 0,8%.

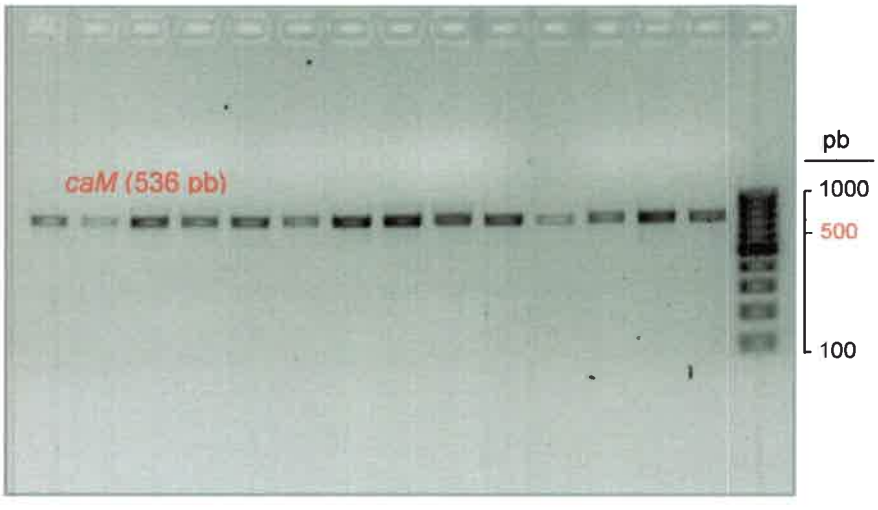


Figura 37. Amplificación del gen de la calmodulina (*caM*) en un gel de agarosa al 0,8%.

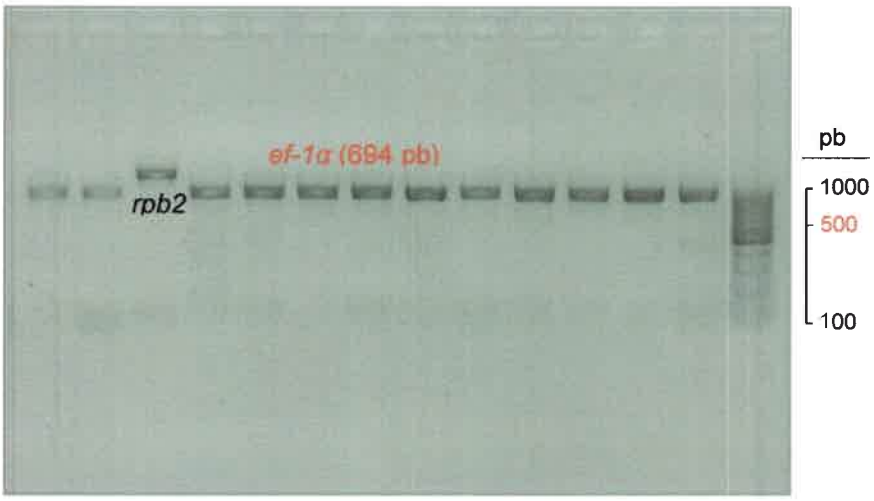


Figura 38. Amplificación del gen del factor de elongación 1α (*ef-1α*) (también se observa una banda del gen de la subunidad de la ARN polimerasa II) en un gel de agarosa al 0,8%.

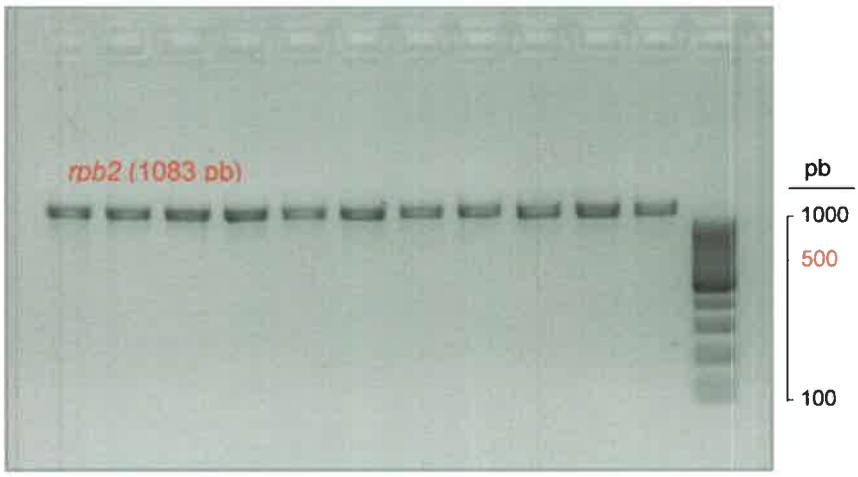


Figura 39. Amplificación del gen de la subunidad de la ARN polimerasa II (*rpb2*) en un gel de agarosa al 0,8%.

La historia evolutiva de las cepas se determinó mediante la construcción de un árbol filogenético utilizando el método de distancias Neighbor-Joining (Saito y Nei, 1987). El árbol obtenido mediante el gen *rpb2* mostró una mayor variabilidad intraespecífica que el obtenido mediante los genes de la benA, caM y *ef-1α*. Sin embargo, las secuencias de las regiones amplificadas de los genes se analizaron filogenéticamente como un conjunto de datos combinados, a causa de que en todos los árboles se reflejó un agrupamiento similar (Figura 40).

Seis linajes agrupados en cuatro clados principales fueron identificados dentro de la sección *Nigri*. En el clado I se incluyó el mayor número de cepas analizadas (n=72) y se agruparon junto a la cepa de referencia *A. tubingensis* ITEM 7040 con un bootstrap del 97%.

Las cepas ASNRC 8, 10 y 60 fueron consideradas previamente como *A. tubingensis* "atípicas" por AFLP debido a su baja homología con la cepa de referencia. Sin embargo, mediante el secuenciamiento multigénico se lograron identificar a nivel de especie demostrando que correspondían a la especie *A. tubingensis*. Nueve cepas incluidas en este clado fueron positivos para la producción de OTA.

El clado II estuvo representado por 14 cepas identificadas como pertenecientes al agregado *A. niger* por morfología clásica y agrupadas dentro del grupo de especies de *A. niger* por análisis filogenético, en particular con las cepas de referencia de *A. awamori/niger* ITEM 4509 y *A.awamori* ITEM 4502 (bootstrap 99%). Dentro de este grupo, dos cepas fueron productoras de OTA y cinco productoras de fumonisinas. Los niveles de producción de FB_2 y FB_4 variaron de 223 a 17.450 y de 69,3 a 6.955 ng/ml, respectivamente. La producción de FB_s no fue detectada por las cepas incluidas en los demás clados.

El clado III agrupó 7 cepas de *A. carbonarius* que se ubicaron junto con la cepa de referencia *A. carbonarius* ITEM 4503 con un bootstrap del 100%. La ubicación de la cepa de *A. carbonarius* ASNRC 252 dentro de este grupo demostró un error de identificación, debido a que previamente había sido clasificada morfológicamente como perteneciente al agregado *A. niger*. Las cepas de *A. carbonarius* que no produjeron niveles detectables de OTA en el medio CYA fueron reevaluadas utilizando los medios de cultivo PDB y YES, y resultaron positivas para su producción. Por lo tanto, todas la cepas incluidas en este clado fueron productoras de OTA.

En el último clado se agruparon cinco cepas identificados morfológicamente como uniseriadas y a nivel de especie por secuenciamiento, como *A. japonicus*. Las cepas incluidas en este clado se agruparon junto a la cepa de referencia *A. japonicus* ITEM 7034 con un bootstrap del 100%. No se detectó la producción de OTA entre las cepas agrupadas en este clado.

Las especies biseriadas, *A. foetidus* y *A. homomorphus,* no identificadas previamente por el análisis de AFLP, se agruparon junto a las cepas de referencia *A. foetidus* ITEM 4507 y *A. homomorphus* ITEM 11870 con un bootstrap del 99% y 100%, respectivamente. La cepa de *A. homomorphus* previamente había sido identificada morfológicamente como *A. carbonarius* debido al tamaño de sus conidios (7 mm).

Las cepas evaluadas no se agruparon con las otras especies de referencia incluidas, tales como: *A. costaricaensis, A. vadensis, A. brasiliensis, A. lacticoffeatus, A. ibericus, A. sclerotioniger, A.* uvarum y *A. aculeatus.*

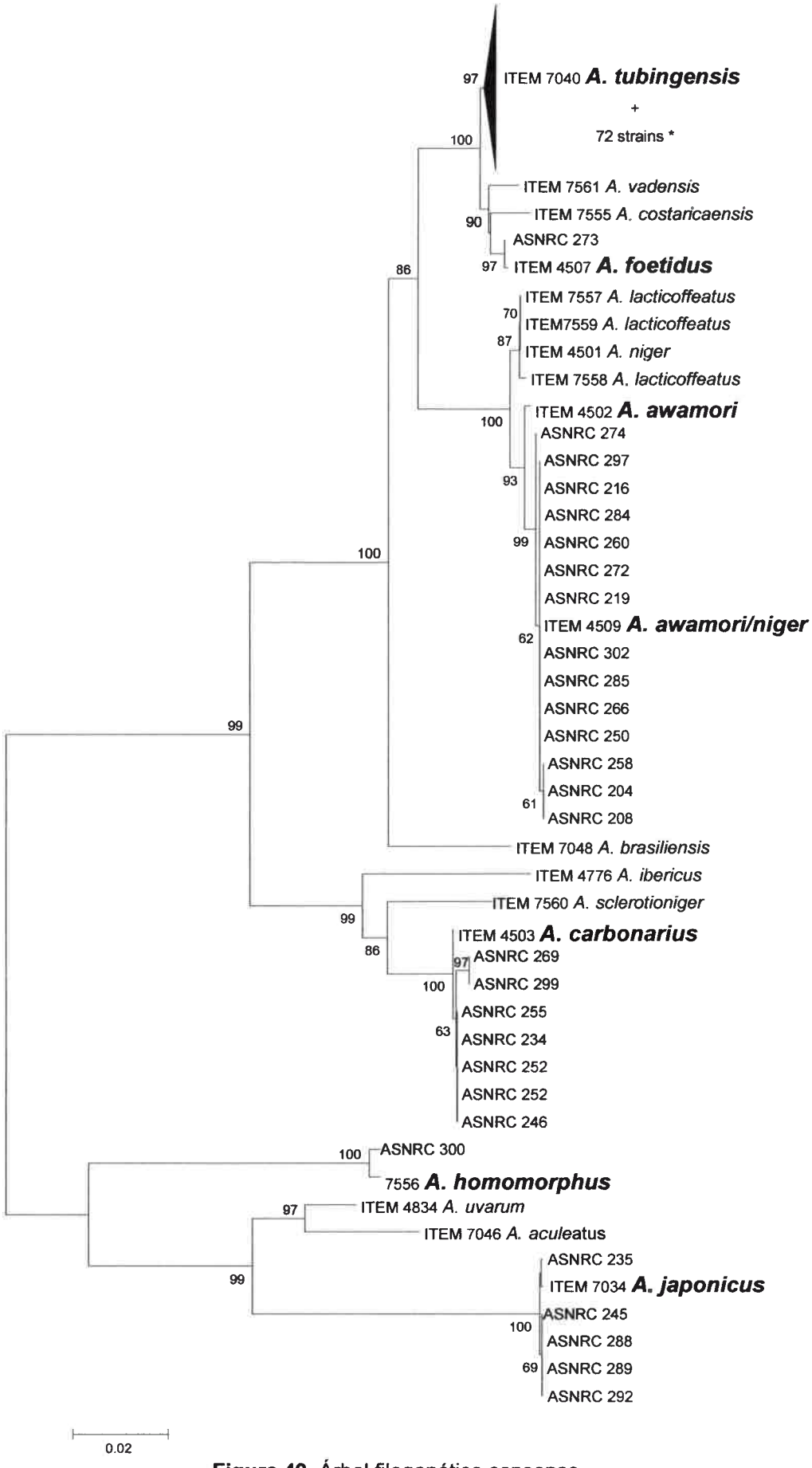


Figura 40. Árbol filogenético consenso.

Tabla 19. Origen y producción de ocratoxina A/fumonisinas por las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* incluidas en el análisis.

Cepa	Especie	Origen	OTA	FB_2/FB_4	Año
ASNRC 220	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2006/07
ASNRC 226	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	nd	2006/07
ASNRC 225	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2007/08
ASNRC 210	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	nd	2006/07
ASNRC 248	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	nd	2008/09
ASNRC 251	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	nd	2008/09
ASNRC 209	*A. tubingensis*	Neuquén - Río Negro	nd	nd	2006/07
ASNRC 212	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2007/08
ASNRC 249	*A. tubingensis*	San Juan - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 243	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 262	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 268	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 286	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 211	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2007/08
ASNRC 296	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	++	nd	2008/09
ASNRC 215	*A. tubingensis*	Neuquén - Río Negro	nd	nd	2007/08
ASNRC 277	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 287	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 10	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2006/07
ASNRC 275	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 222	*A. tubingensis*	Neuquén - Río Negro	nd	nd	2006/07
ASNRC 227	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2007/08
ASNRC 8	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2007/08
ASNRC 290	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 229	*A. tubingensis*	Neuquén - Río Negro	nd	nd	2006/07
ASNRC 217	*A. tubingensis*	Neuquén - Río Negro	nd	nd	2007/08
ASNRC 238	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 233	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 253	*A. tubingensis*	San Juan - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 281	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 231	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2007/08
ASNRC 301	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 241	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	++	nd	2008/09
ASNRC 283	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 293	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 254	*A. tubingensis*	San Juan - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 270	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 263	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 264	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 236	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 230	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	+	nd	2007/08
ASNRC 213	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2007/08
ASNRC 228	*A. tubingensis*	San Juan - Chilecito	nd	nd	2006/07
ASNRC 280	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 218	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2007/08
ASNRC 291	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	++	nd	2008/09
ASNRC 265	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 214	*A. tubingensis*	Neuquén - Río Negro	nd	nd	2007/08
ASNRC 256	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2008/09
ASNRC 242	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	++	nd	2008/09
ASNRC 279	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09

Continuación de la Tabla 19.

Cepa	Especie	Origen	OTA	FB_2/FB_4	Año
ASNRC 271	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 224	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2007/08
ASNRC 278	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 244	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 259	*A. tubingensis*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2008/09
ASNRC 261	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 237	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 239	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 232	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	+	nd	2007/08
ASNRC 240	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	++	nd	2008/09
ASNRC 276	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 60	*A. tubingensis*	San Juan - Valle del Tulum	nd	nd	2007/08
ASNRC 282	*A. tubingensis*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 221	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2006/07
ASNRC 295	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 207	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2007/08
ASNRC 267	*A. tubingensis*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 223	*A. tubingensis*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2007/08
ASNRC 294	*A. tubingensis*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 273	*A. foetidus*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 274	*A. niger*	Mendoza - Noreste	nd	nd	2008/09
ASNRC 297	*A. niger*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 216	*A. niger*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2006/07
ASNRC 284	*A. niger*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 260	*A. niger*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 272	*A. niger*	Mendoza - Noreste	nd	+++	2008/09
ASNRC 219	*A. niger*	Mendoza - Noreste	nd	+++	2006/07
ASNRC 302	*A. niger*	La Rioja - Chilecito	nd	+++	2008/09
ASNRC 285	*A. niger*	Mendoza - Sur	++	+++	2008/09
ASNRC 266	*A. niger*	Mendoza – Valle de Uco	nd	nd	2008/09
ASNRC 250	*A. niger*	San Juan - Chilecito	nd	++	2008/09
ASNRC 258	*A. niger*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2008/09
ASNRC 204	*A. niger*	San Juan - Valle del Tulum	+	nd	2006/07
ASNRC 208	*A. niger*	Mendoza - ZARM	nd	nd	2006/07
ASNRC 255	*A. carbonarius*	San Juan - Chilecito	++	nd	2008/09
ASNRC 234	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	nd	2008/09
ASNRC 252	*A. carbonarius*	San Juan - Chilecito	+	nd	2008/09
ASNRC 246	*A. carbonarius*	San Juan - Chilecito	++	nd	2008/09
ASNRC 247	*A. carbonarius*	San Juan - Chilecito	++	nd	2008/09
ASNRC 269	*A. carbonarius*	La Rioja - Chilecito	++	nd	2008/09
ASNRC 299	*A. carbonarius*	Mendoza - Valle de Uco	++	nd	2008/09
ASNRC 300	*A. homomorphus*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 235	*A. japonicus*	La Rioja - Chilecito	nd	nd	2008/09
ASNRC 245	*A. japonicus*	Neuquén – Río Negro	nd	nd	2008/09
ASNRC 288	*A. japonicus*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 289	*A. japonicus*	Mendoza - Sur	nd	nd	2008/09
ASNRC 292	*A. japonicus*	Mendoza - Valle de Uco	nd	nd	2008/09

nd: niveles de OTA no detectados.

Niveles de OTA: + <100; ++ 100– 1000 ng/gr.
Niveles de OTA: + <1000; 1000- 17000 ng/gr.

Las dificultades en la identificación de las especies incluidas en la sección *Nigri* sugieren la necesidad de realizar una adecuada caracterización molecular, ya que los

perfiles de toxinas de las cepas individuales varían y definen un posible riesgo toxicológico. En el presente estudio, para clarificar la identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de las uvas se llevó a cabo el estudio genético de sus poblaciones a través del uso de marcadores moleculares ($AFLP_s$) y el secuenciamiento.

En el análisis por secuenciamiento, las poblaciones tuvieron un agrupamiento similar al observado por AFLP y se diferenciaron dos nuevas especies biseriadas, *A. foetidus* y *A. homomorphus*. La presencia de cepas de *A. foetidus* había sido observada previamente en uvas en estudios realizados en Argentina (Magnoli y col., 2003; Chulze y col., 2006; Ponsone y col., 2007). Sin embargo, la identidad de esta especie no había sido confirmada utilizando métodos moleculares. En al caso de *A. homomorphus*, aunque sólo una cepa fue identificada, su aislamiento es relevante debido a que es una especie que raramente se encuentra en viñedos y previamente no había sido identificada en Sudamérica. Esta especie es distinguida de los demás *Aspergillus* negros por su perfil de extrolitos y es única en la producción de ácido dehidrocarólico (Samson y col., 2004).

Las especies pertenecientes al "agregado" *A. niger* son indistinguibles morfológicamente, por lo que las metodologías desarrolladas fueron muy útiles para su identificación. Mediante el análisis por AFLP las cepas incluidas en el agregado *A. niger* se separaron en dos clados, el "agregado" *A. niger* y *A. tubingensis*. Las cepas incluidas en el primer clado mostraron un alto grado de diversidad genética y no tuvieron ninguna homología distintiva con las cepas de referencia de *A. awamori* o *A. niger*. Sin embargo, el clado *A. tubingensis* se diferenció claramente y estuvo representado por la mayoría de las cepas aisladas. Mediante el secuenciamiento de los 4 genes evaluados, las cepas incluidas en el "agregado" *A. niger* por morfología clásica se lograron identificar a nivel de especie y fueron agrupadas en dos principales clados, *A. tubingensis* y *A. awamori*. *A. awamori* fue recientemente considerada como una especie filogenética críptica dentro del grupo *A. niger* (Perrone y col., 2011). Tres de las cepas consideradas como atípicas por AFLP fueron incluidas en el análisis y fueron agrupadas junto con la cepa de referencia de *A. tubingensis*, confirmando que pertenecían a dicha especie. Anteriormente, la especie *A. tubingensis* no había sido descripta en Argentina y, teniendo en cuenta su frecuencia de aislamiento y el perfil ocratoxigénico de las cepas, la caracterización de esta especie es relevante. Los resultados de biodiversidad de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* son consistentes con los datos obtenidos en viñedos europeos mediante el análisis de AFLP y el secuenciamiento de los genes de la β-tubulina, la calmodulina y el ARNr (Perrone y col., 2006b). Resultados similares se obtuvieron utilizando otros marcadores moleculares como la rep-PCR (Palencia y col., 2009), ITS-RFLP (Martines-Culebras y Ramón, 2007) y RFLP (Oliveri y col., 2008), conjuntamente con el secuenciamiento de genes. La capacidad de diferenciar *A tubingensis* del agregado *A. niger* mediante el análisis molecular abre la

posibilidad de evaluar sus características ecofisiológicas, a fin de determinar si presenta alguna característica ecológica distinta como preferencias de un hospedador, de condiciones de temperatura y disponibilidad de agua para el crecimiento y/o la producción de toxina. La mayor frecuencia de aislamiento de las cepas de *A. tubingensis* en el presente estudio sugiere que posiblemente estén mayormente adaptadas al agro-ecosistema de las uvas.

La especie *A. carbonarius* fue distinguida morfológicamente de las demás especies biseriadas y mediante ambos análisis moleculares se pudo separar claramente formando un grupo homogéneo. Previamente, Schmidt y col. (2004) detectaron un alto grado de similitud genética por AFLP entre las cepas de *A. carbonarius* aisladas de muestras de café verde y, los fragmentos de ADN generados permitieron el diseño de cebadores de PCR específico para dicha especie. Por otro lado, el diseño de cebadores basados en las secuencias parciales y conservadas del gen de la calmodulina para la detección de *A. carbonarius,* también ha suministrado una herramienta rápida y sólida para la predicción de los riesgos relacionados con la contaminación por OTA en uvas y subproductos (Perrone y col., 2004; Mulé y col., 2006; Susca y col., 2007a).

Aunque los marcadores por AFLP permitieron la separación del clado *A.* uniseriados de los demás grupos, estos marcadores no fueron útiles para discriminar las cepas a nivel de especie. Sin embargo, mediante el análisis por secuenciamiento todas las cepas uniseriadas se agruparon con la cepa de referencia de *A. japonicus*. Dicho clado mostró una asociación alta con *A. homomorphus*, lo cual concuerda con un estudio previo donde las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* fueron analizadas utilizando la secuencia del gen de la β-tubulina (Samson y col., 2004). Recientemente, nuevas especies uniseriadas fueron descriptas en viñedos europeos, pero se aíslan ocasionalmente de las uvas (Noonin y col., 2008; Perrone y col., 2008; Varga y col., 2011). Las especies *A. japonicus* y *A. aculeatus* son aisladas con mayor frecuencia y aunque crecen en las mismas condiciones que *A. carbonarius* no producen niveles detectables de ocratoxina A (Cozzi y col., 2007; Chiotta y col., 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos sobre la producción de OTA por las cepas aisladas, se ha evidenciado la importante contribución de *A. carbonarius* en la contaminación con OTA en las uvas. Esta información se deriva no solo por el porcentaje alto de cepas productoras sino también de los altos niveles de producción detectados durante todas las vendimias analizadas. Cuatro de las cepas de *A. carbonarius* incluidas en el presente estudio habían sido previamente consideradas como no ocratoxicogénicas. Una de ellas fue identificada como *A. homomorphus* debido al tamaño de sus conidios, pero las demás fueron correctamente identificadas. En primera instancia se pensó que posiblemente habían perdido la capacidad de producir OTA ó que el medio de cultivo utilizado no era el

adecuado. Por tal motivo, se evaluó la capacidad toxigénica de las cepas en diferentes medios de cultivo y, como resultado, produjeron niveles de toxina detectables. Algunas cepas de *A. niger* y *A. tubingensis* aislados en el presente estudio también mostraron la capacidad de producir OTA. Mientras que algunos autores consideran que la especie *A. tubingensis* no es productora de OTA (Accensi y col., 2001, Gomez y col., 2006; Frisvad y col., 2007; Nielsen y col., 2009), otros han confirmado que dicha especies es potencialmente productora (Medina y col., 2005; Perrone y col., 2006a).

El descubrimiento de homólogos de los genes para la biosíntesis de fumonisinas de *F. verticillioides* en el genoma de *A. niger* llevó al estudio de la producción de FB_s por las cepas de *A. niger* (Bayman y col., 2006; Frisvad y col., 2007; Pel y col., 2007; Noomin y col., 2009; Logrieco y col., 2010). Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas derivadas de los policétidos, descubierta por primera vez en 1988 en *F. verticillioides* (Gelderblom y col., 1988). Este grupo de compuestos es de gran importancia ya que se sospecha su carcinogenicidad en los seres humanos, y son producidos principalmente en los productos a base de maíz (FAO, 2001; Marasas y col., 2004). Las cepas incluidas en el clado *A. niger* por secuenciamiento en el presente estudio produjeron ambas micotoxinas, ocratoxina A y fumonisinas. Los niveles de FB_s detectados fueron altos y la frecuencia de producción fue mayor que la informada para OTA. En estudios previos realizados en uvas y pasas de uvas, los niveles de FB_2 y FB_4 variaron de 5 a 7.841 µg/kg y de 14 a 1.157 µg/kg, respectivamente. Aproximadamente el 77% de las cepas identificadas como *A. niger* fueron productoras de fumonisinas y por lo tanto, con mayor frecuencia que la producción de OTA (6-10%) (Battilani y col., 2006a; Mogensen y col., 2010).

Bau y col. (2006) mediante el análisis por RFLP agruparon cepas pertenecientes al agregado *A. niger* en los subgrupos *N* y *T*, incluyendo todas las cepas ocratoxigénicas en el subgrupo *N*. Zanzotto y col. (2006), también analizaron cepas pertenecientes al agregado *A. niger* por medio del secuenciamiento de las regiones ITS e IGS y el gen de la β-tubulina, a fin de discriminar entre cepas productoras de OTA y no productoras. La digestión del amplicón IGS con *Hinf* I y de los otros dos amplicones con *Rsa* I, reveló un tipo de perfil ("T-C-C") asociados a las cepas que carecían de la capacidad de producción de la toxina. Aunque estos estudios han intentado evaluar asociaciones entre la variación genética y fenotípicas de las cepas incluidas en la sección *Nigri*, ninguno permitió una diferenciación clara entre ellas. En el presente estudio tampoco se pudieron separar las cepas productoras de OTA de las no productoras, ya que las cepas con ambos perfiles se ubicaron en forma dispersa en los diferentes clados.

El presente estudio aporta a nivel de Sudamérica, datos originales sobre la caracterización molecular de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas a partir de uvas cultivadas en las distintas regiones vitivinícolas de Argentina.

CONCLUSIONES - Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

- En las muestras de uvas cosechadas en las diferentes regiones vitivinícolas de Argentina se observó una distribución diferente de las especies fúngicas según la vendimia y la variedad de uva evaluada. *Alternaria y Aspergillus* fueron los géneros potencialmente toxigénicos aislados con mayor frecuencia.

- La biodiversidad de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* según el orden de frecuencia de aislamiento estuvo representada por: el agregado *Aspergillus niger*, *Aspergilus carbonarius* y los *Aspergillus* uniseriados. A través del uso de marcadores moleculares generados por $AFLP_s$ se identificaron cuatro grupos dentro de la sección *Nigri*, diferenciado claramente *A. tubingensis* del agregado *A. niger*. El análisis filogenético confirmó la presencia de dichas poblaciones y permitió su identificación nivel de especie, discriminando *A. carbonarius, A. tubingensis, A. niger*, *A. japonicus*, *A. foetidus* y *A. homomorphus*.

- Las condiciones ambientales, principalmente la temperatura, y las prácticas de manejo desarrolladas en los viñedos influyeron sobre la distribución de las especies incluidas en la sección *Nigri*.

- La micoflora toxigénica estuvo representada por *A. carbonarius*, *A. tubingensis* y *A. niger*. *A. carbonarius* fue relevante como productor de ocratoxina A y *A. niger* como productor de fumonisinas.

- Los niveles de ocratoxina A detectados en las uvas y vinos fueron bajos y en la mayoría de las muestras menores al nivel legislado por la Comunidad Europea (2µg/L). Sin embargo, la variedad de uva y el daño producido por insectos afectó la susceptibilidad a la infección fúngica como la contaminación con ocratoxina A.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan datos al avance en el conocimiento de la distribución de la biodiversidad de *Aspergillus* sección *Nigri* en viñedos de Argentina y a la influencia de de los factores agro-ecológicos y las prácticas de culturales desarrolladas en las diferentes zonas vitivinícolas. La aplicación de adecuadas estrategias de manejo en los viñedos para reducir o impedir el desarrollo de las especies toxigénicas, en particular *A. carbonarius*, podría predecir el riesgo toxicológico existente en determinadas zonas.

La perspectiva futura que se desprende del presente trabajo de tesis es profundizar los estudios sobre la caracterización eco-fisiológica de las especies de *Aspergillis* sección *Nigri* potencialmente ocratoxigénicas. A tal fin:

- Se evaluará el crecimiento fúngico y la producción de ocratoxina A bajo condiciones *in vitro* a diferentes temperaturas y actividades de agua (a_w). En el apartado IV-6 de la sección I de este trabajo se mostró que las cepas de *Aspergillus carbonarius* con mayor potencial para producir ocratoxina A se aislaron con más frecuencia en las regiones vitivinícolas donde se registraron las temperaturas más altas. La humedad y las precipitaciones influyeron en su aislamiento en forma variable, dependiendo del año evaluado. La influencia de las condiciones ambientales sobre las cepas perteneciente al agregado *A. niger* no fue tan marcada. Para confirmar dichos resultados se plantea evaluar la interacción de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de ocratoxina A por especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de uvas, en medio de cultivo.

- Se determinarán los efectos de la interacción fúngica a diferentes condiciones ambientales sobre la producción de ocratoxina A. Como se describió en el apartado IV-3 de la sección I de este trabajo, la incidencia de las especies del agregado *A. niger* es alta en todas las regiones vitivinícolas de Argentina. En el apartado IV sección II, los análisis moleculares revelaron que dentro del agregado *A. tubingensis* es la especie más frecuente, lo cual sugiere que posiblemente esté mayormente adaptada al agro-ecosistema de las uvas o presente alguna ventaja selectiva en comparación con el resto de las especies aisladas. En base a lo planteado, se evaluará *in vitro* el efecto de la interacción entre diferentes especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* a diferentes actividades de agua y temperaturas sobre el crecimiento y la producción de ocratoxina A.

Los resultados podrían explicar la mayor adaptación de las cepas que se aíslan con mayor frecuencia en determinadas regiones vitivinícolas y el riesgo de contaminación de OTA en uvas.

BIBLIOGRAFIA

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., 2001. Current importance of Ochratoxin A- producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection,* 64: 903-906.

Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F.J., 2004. Taxonomy and significance of black aspergilly. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 33-49.

Abrunhosa, L., Serra, R., Venâncio, A., 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50: 7493-7496.

Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M.L., Cabanes, F.J., 1999. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 191-196.

Accensi, F., Abarca, M.L., Cano, J., Figuera, L., Cabanes, F.J., 2001. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79: 365-370.

Al-Musallam, A., 1980. *Aspergillus helicothrix*, sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 46: 407-411.

Astoreca, A.L., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2010. Ecophysiology of *Aspergillus* section *Nigri* species potential ochratoxin A producers. *Toxins*, 2: 2593-2605.

Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 313–318.

Baker, S.E., 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology*, 44: 17-21.

Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology,* 108: 639-643.

Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A., 2003a. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 715-722.

Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Bertuzzi, T., Barbano, C., 2003b. Growth and ochratoxin A production of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Italian grapes. *Aspects of Applied Biology*, 68: 175–180.

Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., Pietri, A., 2004a. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 84: 1736-1740.

Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2004b. Mycotoxins in Food: detection and control. In: Magan, N. and Olsen, M. (eds). Woodhead Pulishing, Cambridge, U.K, pp: 244-261.

Battilani, P., Barbano, C., Marín, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z., Magan, N., 2006a. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology,* 111: 72–82.

Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., Pietri, A., 2006b. Black Aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 53–60.

Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A., 2006c. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 2-4.

Battilani, P., 2008. Prevention of ochratoxin A in grapes and wine. In: Leslie J.F, Visconti, A. (eds). Micotoxins. CABI, United Kingdom, England, pp: 1-464.

Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabañez, F.J., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grape. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 125-130.

Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., 2006. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology,* 111: 18–21.

Bayman, P., Baker, J.L., 2006. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia,* 162: 215–223.

Becerra, V., Catania, C., Avagnina, S., 2004-2005. Ensayos de microvinificación a escala piloto en el Centro de Estudios Enológicos de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (INTA). Proyecto Nacional Nº 2068: Tecnología para una producción diferenciada en vid.

Becerra, V., 2005. Se investiga el manejo de la cochinilla harinosa de la vid. *Ruralis,* 1: 8-11.

Becerra, V., González, M., Herrera, M.E., Miano, J.L., 2006. Dinámica poblacional de *Planococcus ficus* Sign. (Hemiptera - Pseudococcidae) en viñedos. Mendoza (Argentina). *FCA UNCuyo*, 1: 1-6.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology,* 96: 19–27.

Bellí, N., Mitchell, D., Marín, S., Alegre, I., Ramos, A.J., Magan, N., Sanchis, V., 2005a. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 233-239.

Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marín, S., 2005b. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology,* 98: 839-844.

Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J., Bragulat, M.R, 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 40-45.

Berbee, M.L., Taylor, J.W., 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In: McLaughlin, D., McLaughlin, E., Lemke, P. (eds). The Mycota: systematics and evolution. Berlin, Springer-Verlag, pp: 229–245

Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 204-209.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Annual Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.

Bouras, N.; Mathieu, F.; Coppel, Y.; Strelkov, S. E.; Lebrihi, A., 2007. Occurrence of naphtho-gamma-pyrones- and ochratoxin A-producing fungi in French grapes and characterization of new naphthogamma pyrone polyketide (aurasperone G) isolated from *Aspergillus niger* C-433. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55: 8920–8927.

Bragulat M.R., Abarca M.L., Accensi F., Cabañes F.J., 1998. New screening method for ochratoxigenic molds in pure cultures. *Acta Veterinaria Scandinavica,* 22: 515-520.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An easy screening meted for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 139-144.

Breitholtz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I., Hult, K., 1993. Ochratoxin A in cows milk and in human milk with corresponding human blood samples. *Journal of AOAC International*, 76: 842–846.

Bufflier, E., Susca, A., Baud, M., Mulé, G., Brengel, K., Logrieco, A., 2007. Detection of *Aspergillus carbonarius* and other black aspergilli from grapes by DNA OLISA™ microarray. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1138-1147.

Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiol*ogy, 79: 213-215.

Carbonneau, A., 1989. L'exposition utile du feuillage: Definition du potentiel du systeme de conduite. *Gesco*, 4: 25-47.

Carbonneau, A., 1992. Estudio ecofisiológico de los principales sistemas de conducción, interés cualitativo y económico de las viñas en lira primeros resultados de su comportamiento en clima cálido y seco. *Vitivinicultura*, 6: 18-32.

Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., Bartsh, H., 1991. Mycotoxins, endemic Nephropathy and Uranary Tract Tumors. International Agency for Research on Cancer (IARC). Scientific publication N° 115. Lyon, France.

Catania, C., Avagnina, S., 2010. Factores agroclimáticos que afectan el perfil sensorial de los vinos. In: Catania, C., Avagnina (eds). La interpretación sensorial del vino. INTA, Mendoza, Argentina, pp: 125-151.

Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2009. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiol*ogy, 136: 137–141.

Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2006. Occurrence of ochratoxin a in wine and ochratoxigenic mycoflora in grape and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 5-9.

Clarke, K., Emmett, R.W., Kazi, B.A., Nancarrow, N., Leong, S., 2003. Susceptibility of dried grape varieties to berry splitting and infection by *Aspergillus carbonarius* (abstract). 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, pp: 140.

Couch, B.C, Kohn, L.M., 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94: 683-693.

Cozzi, G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A., Logrieco, A., 2006. Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International Journal of Food Microbiology,* 111: 88-92.

Cozzi, G., Perrone, G., Epifani, F., Pascale, M., Visconti, A., 2007. Epidemiology of ochratoxin A producing fungi in Apulian vineyards. Poster 1422r presented at XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 2007 May 21–25, Istanbul.

Cruse, M., Teletant, R., Gallagher, T., Lee, T., Taylor, J.W., 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum. Mycologia,* 94: 814–822.

Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E., Dalcero A.M., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants,* 19: 408–414.

Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G.,Rosa, C.A.R., 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants,* 19:1065-1072.

Dao, H.P., Mathieu, F. y Lebrihi, A., 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 61–67.

De Vries, R.P., Burgers, K., van de Vondervoort, P.J.I., Frisvad, J.C, Samson, R.A., Visser, J., 2004. A new black *Aspergillus* species, *A. vadensis*, is a promising host for homologous and heterologous protein production. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3954-3959.

Degola, F., Berni, E., Dall'Asta, C., Spotti, E., Marchelli, R., Ferrero, I., Restivo, F.M., 2007. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 409-417.

Desjardins, A.E., 2006. Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology, American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

Díaz, G.A., Torres, R., Vega, M., Latorre, B.A., 2009. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 133: 195-199.

Dice, L.E., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.

Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry, D.W., Nicholson, P., 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3850-3854.

Edwards, S.G., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W., 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, 106: 1005-1025.

Egger, E., 1994. Parametri biometrici delle forme di allevammento e difensa fitosanitaria. Vignevini, XXI, N° 9.

Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., 2004. Effects of temperature and incubation time on production ofochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology,* 155: 861-866.

European Commission. 2005. Regulation (EC) N° 856/2005 of 6 June 2005 amending regulation (EC) N° 466/2001 as regards *Fusarium* toxins. *Official Journal of the European Union*, 143: 3–8.

European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364: 5-24.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Fermaud, M., Le Menn, R., 1989. Association of *Botrytis cinerea* with Grape Berry Moth Larvae. *Phytopatology*, 79: 651-656.

Fermaud, M., Le Menn, R., 1992. Transmission of *Botrytis cinerea* to grape by grape berry moth larvae. *Phytopathology,* 82: 1393-1398.

Ferreira, M.E., Grattapaglia, D., 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en análisis genético. Embrapa-Cenargen, pp: 220.

Ferrer, M., González Neves, G., Camussi, G., 2001. Influencia del sistema de conducción, el raleo de racimos y el sistema de poda sobre el daño de podredumbre de racimos. In: Actas VIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. (CD)

Ferrer, M., Pedocchi, R., González Neves, G., Silva, A., Michelazzo, M.; Carbonneau, A., 2008. Regiones vitícolas del Uruguay. Delimitación y descripción de en base a índices bioclimáticos. *Revista Enología.* Nº4 1 Año V.

Food and Nutrition (FAO), 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. FAO, Rome. Paper 74.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U., 2007. Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:* 9727–9732.

Fungaro, M.H., Vissotto, P.C., Sartori, D., Vilas-Boas, L.A., Furlaneto, M.C., Taniwaki, M.H., 2004. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*, 49: 123–127.

Gabriel, K.R., 1971. Biplot display of multivariate matrices with application to principal components analysis. *Biometrika,* 58: 453-467.

Gallo, A., Perrone, P., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A.D.W., Mulè, G., 2009. Characterization of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius. International Journal of Food Microbiology*, 129: 8–15.

Gams, W., Chistrensen, M., Onion, A.H.S., Pitt, J.I., Samson, R.A., 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Plenum Press, Nueva York, EEUU, pp: 55-64.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59: 1-10.

Geiser, D.M., 2008. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, 12: 1-6.

Gelderblom, W.C., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R., Kriek, N.P., 1998. Fumonisins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1806-1811.

Gizinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the main stream. *Experimental Hematology,* 30: 503-512.

Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330.

Goldberg, I.; Rokem, J.S.; Pines, O., 2006. Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*, 81: 1601–1611.

Gómez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S., Cabañes, F.J., 2006. Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology,* 23: 541-545.

González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters,* 245:353-61

Heenan, C.M., Shaw, K.J., Pitt, J.I., 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbenarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Microbiology,* 1: 67–72.

Hibbett, D.S, Binder, M., Bischoff, J.f., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S.S, James, T., Kirk, P.M., Lücking R., Lumbsch, H.T, Lutzoni, F., Matheny, P.B, McLaughlin, D.J., Powell, M.J, Redhead, S., Schoch, C.L, Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A, Crous, P.B, Da, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y. y Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547.

Hidalgo, L., 2003. Poda de la Vid. Sexta edición, revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

Hocking, A.D., Leong, S.L., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2007. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 84-88.

Hotelling, H., 1936. Relations between two sets of variables. *Biometrika*, 28: 321-377.

http://www.inta.gov.ar. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

http://www.inv.gov.ar. Instituto Nacional de Vitivinícultura.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Ochratoxin A. In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic amines and mycotoxins, vol. 56. IARC, Lyon, France. Pp. 489–521.

James, P., Vorherr, T., Carafoli, E., 1995. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? Trends in Biochemical Sciences, 20: 38-42.

Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA). Available online: http://www.who.int/ ipcs/food/jecfa/en/ (accessed on 28 July 2010).

Jurado, M., Marin, P., Magan, N., Gonzalez-Jaen, M.T., 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2032-2036.

Kappes, M.E, Serrati, L., Drouillard, J.B., Cantus, J.M., Kazantzidou, M., 2006. A crop protection approach to *Aspergillus* and OTA management in Southern European vineyards. Infowine, Proccedings of "International Workshop – Ochratoxin A in grapes and wine: Prevention and Control". Marsala, Italia, pp: 8-9.

Karaffa, L.; Kubicek, C.P., 2003. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 189–196.

Kazí, B.A, Emmett, R.W., Nancarrow, N., Charke, K., 2004. Incidence of *Aspergillus carbonarius* in Australian vineyards. In: Ophel-keller K., Hall B. (Eds), 3er Australasian Soi-Borne Disease Symposium. Tanunda South Australia, Australia, pp. 75-76.

Kazi, B.A., Emmett, R.W., Murdoch, R., Partington, D., Nancarrow, N., 2006. Effect of irrigation and other cultural practices on the incidence of *Aspergillus carbonarius* and other black Aspergillus spp. in vineyards. In: Emmett, R.W. (Ed.), Sustainable Management of *Aspergillus carbonarius* in Vineyards. Final Report to Horticulture Australia. Cooperative Research Centre for Viticulture, Urrbrae, SA, Australia, pp. 32–42.

Kerényi, Z., Zeller, K., Hornok, L., Leslie, J.F., 1999. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4071–4076.

Klich, M.A., Pitt, J.I., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwalth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, Australia, pp: 116.

Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau Voorschimmelculturs. Utrecht, The Netherlands.

Knutsen, A. K., Torp, M., Holst-Jensen, A., 2004. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 287-295.

Kozakiewicz, K., 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers, 161. CAB International, Wallingford, Reino Unido.

Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A., 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research*, 109: 173-186.

Kuiper, Goodman, T., Scott, P.M., 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Science*, 2: 179-248.

Kumeda, Y., Asao, T., 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCRamplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2947-2952.

Kusters-Van Someren, M.A., Kester, H.M.C., Samson, R.A., Visser, J., 1990. In: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press, Nueva York, EEUU, pp: 83-88.

Kusters-Van Someren, M.A., Samson, R.A., Visser, J., 1991. The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, 19: 21-26.

Leong, S., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2004. Ochratoxin A: from grapes to wine. In: Blair, R.J., Pretorius, IS. (eds), Proceedings of the Twelfth Australian wine industry Technical Conference, 24-29. Melbourne. Australian Wine Industry Technical Conference Inc. Adelaide, Australia, pp: 299.

Leong, S.L., 2005. Black *Aspergillus* species: implications for ochratoxin A in Australian grapes and wine. PhD thesis, University of Adelaide.

Leong, S.L, Hocking, A.D., Pitt, J.I. Kazi, B.A., Scott, E.S., 2006a. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 10-17.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2006b. Black *Aspergillus* spp. in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (eds.). Advances in Food Mycology. Springer, New York, pp: 153–171.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scot, E.S., 2006c. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 209-216.

Leong, S.L., 2007. Fungi in wine - implications of vineyard infections. In: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (eds.). Food Mycology: a Multifaceted Approach to Fungi and food. CRC Press, Boca Raton, pp: 303-318.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2007. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology,* 102: 124-133.

Leslie J., Zeller, J.,Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., Ritieni, A., 2004. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology,* 70: 2254-2262.

Liu, Z., Furnier, G.R., 1993. Inheritance and Linkage of Allozymes and Restriction Fragment Length Polymorphisms in Trembling Aspen. *The Journal of Heredity*, 84: 419-424.

Logrieco, A., Ferracane, R., Haidukowsky, M., Cozzi, G., Visconti, A., Ritieni, A., 2009. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. *Food Additives and Contaminants,* 26: 1495-1500.

Logrieco, A., Ferracane, R., Visconti, A., Ritieni, R., 2010. Natural occurrence of fumonisin B_2 in red wine from Italy. *Food Additives and Contaminants*, 27: 1136-1141.

Lopez-Errasquin, E., Vazquez, C., Jimenez, M., Gonzalez-Jaen, M.T., 2007. Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of fum1 and fum19 genes from the Fumonisin producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 312-317.

Magan, N., Olsen, M., 2004. Mycotoxins in Food: detection and control. Woodhead, Cambridge, U.K.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A., 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letter Applied Microbiology*, 37: 179–184.

Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Da Rocha Rosa, C.A., Dalcero, A., 2004. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letter of Applied Microbiology*, 39: 326-331.

Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P., Oliver, R.P., 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Reserch*, 100: 1107–1111.

Majerus, P., Otteneder, H., 1996. Detection and occurrence of ochratoxinAin wine and grape juice. *Deutusche Lebensmittel-Rundschau*, 92: 388–390.

Mansson, M., Klejnstrup, M.L., Phipps, R.K., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O., 2010. Isolation and NMR characterization of fumonisin B_2 and a new fumonisin B_6 from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58: 949–953.

Marasas, W.F.O., Miller, J.D., Riley, R.T., Visconti, A., 2001. Fumonisins occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW. eds. *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS PRESS. The American.

Marasas, W.F.O., Riley, R.T., Hendricks, K., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W.C.A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., Merrill, A.H., 2004. Fumonisins disrupt shingolipid metabolism, folate transport and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition*, 134: 711–716.

Martinez-Culebras, P.V., Ramon, D., 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 147-153.

Martínez-Culebras, P.V., Crespo-Sempere, A., Sánchez-Hervás, M., Elizaquivel, P., Aznar, R., Ramón, D., 2009. Molecular characterization of the black *Aspergillus* isolates responsible for ochratoxin A contamination in grapes and wine in relation to taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri*. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 33-41.

Medina, A., Mateo, R., Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F.M., Jimenez, M., 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4696-4702.

Micheli P.A., 1729. Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. Florencia, Italia.

Mitchell, D, Aldred, D., Magan, N., 2003. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of *Europe Aspects of Applied Biology*, 68: 109–116.

Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N., 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 439–445.

Miller, J.D., 1994. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases. In: Mycotoxins in Grain: compounds other than Aflatoxin (Miller JD, Trenholm HL, (eds). St. Paul, MN: Eagan Press, pp: 19–36.

Mogensen, J.M, Frisvad, J.C., Thrane, U., Nielsen, K.F., 2010a. Production of fumonisin B_2 and B_4 by *Aspergillus niger* on Grapes and Raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 954–958.

Mogensen, J.M., Larsen, T.O., Nielsen, K.F., 2010b. Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B_2 in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 4853-4857.

Monaci, L., Palmisano, F., 2004. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 96-103.

Moss, M.O., 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additive and Contamminants*, 113: 5- 9.

Mosseray, R., 1934. Sur la systematique des *Aspergillus* de la section 'niger' Thom et Church. *Annales Societé Scientifique de Bruxelles*, Ser. II 54, 72. Cited in Raper, K.B., Fennell, P.I. 1965 *The Genus* Aspergillus. Baltimore: Williams and Wilkins.

Mueller, U.G., Lipari, S.E., Milgroom, M.G., 1996. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) fingerprinting of fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology*, 5: 119-122.

Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L., 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 389-394.

Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 28-34.

Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research,* 8: 4321–4325.

Musser, S.M., Plattner, R.D., 1997. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum,* and *Fusarium nygami. Journal of Agricultural Food Chemistry,* 45: 1169–1173.

Nielsen, K.F., Mogensen, J.M., Johansen, M., Larsen, T.O., Frisvad, J.C., 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 395:1225-1242.

Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 38-46.

Nikkuni, S., Nakajima, H., Hoshina, S., Ohno, M., Suzuki, C., Kashiwagi, Y., Mori, K., 1998. Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 44: 225-230.

Nikoh, N., Hayase, N., Iwabe, N., Kuma, K., Miyata, T., 1994. Phylogenetic relationships of the kingdoms Animalia, Plantae, and Fungi inferred from twenty three different protein species. *Molecular Biology and Evolution,* 11: 762-768.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2008. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1727-1734.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2009. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Additive and Contaminant*, 26: 94-100.

O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2005. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology,* 35: 33-60.

O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I., 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 465-493.

O'Donnell, K., Kistler, C., Tacke, B.K., Casper, H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab. *Proceeding of the Nationality Academy of Sciences*, 97: 7905–7910.

Oliveri, C., Torta, L., Catara, V., 2008. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. *International Journal of Food Microbiology,* 127: 147-154.

Palencia, E. R., Klich, M.A., Glenn, A.E., Bacon, C.W., 2009. Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri. Journal of Microbiological Methods,* 79: 1-7.

Parra, R., Magan, N, 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 429–438.

Pel, H.J.W., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., De Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25: 221–231.

Peraica, M., Domijan, A.M., Matasin, M., Lucic, A., Radic, B., Delas, F., Horvat, M., Bosanac, I., Balija, M., Grgicevic, D., 2001. Variations of ochratoxin A concentration in the blood of healthy populations in some Croatian cities. *Archives Toxicololy*, 75: 410-414.

Perenicova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R., Rossen, L., Hoor-Suykerbyuk, M.T., Visser, J., 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 521-527.

Perrone, G., Susca, A., Stea, G., Mule, G., 2004. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus. Eur. J. Plant Pathol, 110*: 641–649.

Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2006a. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius, Aspergillus tubingensis,* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 680–685.

Perrone, G., Susca, A., Epifani, F., Mulè, G., 2006b. AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 22–27.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology,* 59: 53–66.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., Kocsubé, S., Toth, B., Kozakiewicz, Z., Samson, R.A., 2008. *Aspergillus uvarum* sp. Nov., an uniseriate black *Aspergillus* isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1032–1039.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology,* 115: 1138-1150.

Pertot, I.; Elad, Y.; Tasin, M., 2007. La muffa grigia della vite. Istituto Agrario di San Michele all'Adige, SafeCrop Centre, pp: 66.

Peterson, S.W., 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100: 205-226.

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., 2002. Blakan endemic nephropaty and associated urinary tract tumors: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contamminants*, 19: 282-302.

Pieri, P., Fermaud, M., Mimiague, F., 2001. Analyse du microclimat des grappes- effets de la compacité et de l'effeuillage. In: C.R. XII GESCO Montpellier. France, pp: 71-76.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and Food Spoilage Vol. II. Academic Press, Sydney, Australia.

Pitt, J.I., 2000. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38, Suppl. 1: 17-22.

Pitt, J.I., Basílico, J.C., Abarca, M.L., López, L., 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38: 41-46.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinian wine grapes cultivated under organic and nonorganic systems. *International Journal of Food Microbiology,* 114: 131-135.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology,* 151: 70-77.

Puntaric, D., Bosnir, J., Smit, Z., Skes, I., Baklai, Z., 2001. Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropaty. *Croatian and Medicine Journal*, 42: 175-180.

Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.

Rasmussen, C.D., Means, R.L., Lu, K.P., May, G.S., Means, A.R., 1990. Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 13767-13775.

Rohlf, F.J., 1990. Fitting curves to outlines. In: Rohlf, F.J., Bookstein, F.L. (eds). Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. Museum of Zoology special publication N° 2. Michigan, USA: University of Michigan, pp: 167–177.

Romero-Gonzalez, R., Vidal, J.L.M., Aguilera-Luiz, M.M., Frenich, A.G., 2009. Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 57: 9385-9392.

Roset, M., 2003. Survey on ochratoxin A in grape juice. *Fruit Processing*, 13: 167-172.

Russell, R., Paterson, M., 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41: 1467-1474.

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50: 1306-1311.

Sage, L., Garon, D., Seigle-Murandi, F., 2004. Fungal micoflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5764-5768.

Saitou, N., Nei, N., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

Samson, R.A., 1992. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. In: *Aspergillus*: Biology and industrial applications. Reed Publishing, Stoneham, Massachusetts, EEUU, pp: 355-390.

Samson, R.A., 1994. Taxonomy-current concepts of *Aspergillus* systematics. In: *Aspergillus*. Plenum Press, Nueva York, EEUU, pp: 1-22.

Samson, R.A., 2000. List of names of Trichocomaceae published between 1992 and 1999. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holanda, pp: 73-79.

Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.

Samson, R.A., Hong S.B., Frisvad J.C., 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44: 133-148.

Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J., 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59: 129-145.

Sanger, F., Nicklen S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 5463-5467.

Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H., 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, 157: 350-354.

Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., Migheli, Q., 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and nonproducing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 201-210.

Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H., Niessen, L., 2003. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLPs. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 138-146.

Schmidt, H., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H., Niesen, L., 2004. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in a green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology* 97: 899–909.

Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.C.; Van Dijck, P.W., 2002. On the safety of *Aspergillus niger* ; a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 426–435.

Scott, P.M., Lawrence, G.A., Lau, B.P.Y., 2006. Analysis of wines, grape juices and cranberry juices *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 2: 142-147.

Scott, P.M., 2011. Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives and Contaminants*. DOI: 10.1080/19440049.2010.546000.

Screemannarayana, O., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Marquardt, R.R., Abramson, D., 1988. Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *Journal of Animal Science*, 66: 1703-1711.

Selma, M.V., Martinez-Culebras, P.V., Aznar, R., 2008. Real-Time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 126-134.

Serra, R., Abrnhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A., 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbioly,* 2736: 1-6.

Serra, R., Mendonca, C., Venâncio, A., 2005. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letter in Applied Microbiology,* 42: 42-47.

Serra, R., Cabanes, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G. y Kozakiewicz, Z., 2006a. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*, 98: 295-306.

Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A., 2006b. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110: 971-978.

Smart, R., Robinson, M., 1991. Sunlight into wine: a handbook for winegrappe canopy managment. Underdale S.A., Australia, pp: 88.

Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., Ferguson, J.C., 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of Vitis vinifera cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 171-782.

Storen, O., Holm, H., Storner, F.C., 1982. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied of Environmental Microbiology*, 44: 785-789.

Sørensen, A., Lübeck, P.S., Lübeck, M., Nielsen, K.F., Ahring, B.K., 2011. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a new black *Aspergillus* species isolated in Denmark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Doi: 10.1099/ijs.0.029884-0.

Studer-Rohr, I., Schlatter, J., Dietrich, D.R., 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Toxicokinetics and Metabolism*, 9: 499-510.

Susca, A., Stea, G., Mule, G., Perrone, G., 2007a. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1154-1160.

Susca, A., Stea, G., Perrone, G., 2007b. Rapid polymerase chain reaction (PCR)-singlestranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1148-1153.

Sweeney, M.J., Pamies, P., Dobson, A.D., 2000. The use of reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 97-103.

Swofford, D., 1999. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Tae Yu, S., Yeo, S., Hyun, S.K., 2004. A new species of hyphomycetes, *Aspergillus coreanus* sp. nov., isolated from traditional Korean Nuruk. *Journal of microbiology and biotechnology*, 14: 182-187

Takagi, T., Nemoto, T., Yazawa, K.K., Yagi, K., 1980. The amino acid sequence of the calmodulin obtained from sea anemone (*Metridium senile*) muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96: 377-381.

Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution,* 10: 512–526.

Tamura, K., Dudley, J., Nei M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution,* 24: 1596-1599.

Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., Papageorgiou, I., Tjamos, E.C., 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wineproducing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopatology,* 152: 250-255.

Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C., 2006. *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 61-66.

Tournas, V.H., Stack, M.E., 2001. Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria Alternata* grown on fruits at various temperatures. *Journal of Food Protection,* 64: 528-532.

Vail, M.E; Marois, J.J., 1991. Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 81: 188-191.

Valero, A., Marin, S, Ramos, A.J., Sanchis, V., 2005. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letter in Applied Microbiology,* 41: 196-201.

Varga, J., Kevei, E., Fekete, C., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H., 1993. Restriction fragment length polymorphisms in the mitocondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*, 97: 1207-1212.

Varga, J., Kevei, E., Toth, B., Kozakiewicz, Z., Hoekstra, R.F., 2000. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Canadian Journal of Microbiology,* 46: 593-599.

Varga, J., Péteri, Z., Tábori, K., Téren, J, Vágvölgyi, C., 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 321-328.

Varga, J., Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 72-81.

Varga, J., Kocsube, S., Toth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R.A., 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1925-1932.

Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R.A., 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri. Studies in Mycology,* 69: 1–17.

Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G., 2001. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and HPLC. *Journal of Chromatography*, 864: 89-101.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*, 25: 193-202.

Voetz, M., Rath, F., 2002. Identification and quantification of ochratoxin synthesizing fungi on cereals using real time PCR. Abstracts. American Society of Brewing Chemists, Annual Meeting, Tucson, AZ, pp: 22.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, L.T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Weidenbörner, M., 2001. Foods and fumonisins. *European Food Research and Technology,* 212: 262–273.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Nueva York, EEUU, pp: 315-322.

Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem,* 4: 1120–1128.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.E., Levak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.C., 1990. DNA polymorphims amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6335.

Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M. y Nishimura, K., 2001. Identification, classification and phylogeny of the Aspergillus section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 241-246.

Zanzotto, A., Burruano, S., Marciano, P., 2006. Digestion of DNA regions to discriminate ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains in the *Aspergillus niger* aggregate. *International Journal of Food Microbiology,* 110: 155–159.

Zeller, K.A., Jurgenson, J.A., El-Assiuty, E.M. and Leslie, J.F., 2000. Isozyme and amplified fragment length polymorphism (AFLPs) from *Cephalosporium maydis* in Egypt. *Phytoparasitica* 28, 121–130.

Zeller, K.A., Bowden, R.L., Leslie, J.F., 2003. Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quad-rats in Kansas and North Dakota. *Phytopathology* 93, 874–880.

Zimmerli, B., Dick, R., 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography*, 666: 85–99.

Zimmerly, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contamminants,* 13: 655-668.

ANEXO I – Medios de cultivo, soluciones y buffers

a. Medios de cultivo

Agar Diclorán-Rosa de Bengala-Cloranfenicol (DRBC): Peptona 5g; Glucosa 10g; $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.5g; KH_2PO_4 1g; Diclorán 0.002g; Cloranfenicol 0.1g, Rosa de Bengala 0.0025g; agar-agar 15g; agua destilada 1000 ml.

Agar Diclorán 18% Glicerol (DG18): Glucosa 10g; Peptona 5g; $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.5g; KH_2PO_4 1g; Diclorán 0.002g; Cloranfenicol 0.1g; Glicerol 220g; agua destilada 1000ml.

Agar Czapek-Extracto de Levadura (CYA): K_2PO_4H 1 gr; Extracto de levadura 5 gr; Czapek concentrado 10 mL; Sacarosa 30 gr; Agar 15 gr; Agua destilada 1000 mL.

Agar Extracto de Malta (MEA): Extracto de Malta 20 gr; Glucosa 20 gr; Peptona 1 gr; Agar 15 gr; Agua destilada 1000 mL.

Agar Czapek Extracto de Levadura-Sacarosa (CY20S): KPO_4H_2 1 gr; Czapek concentrado 10 mL; Extracto de levadura 5 gr; Agar 15 gr; Sacarosa 200 gr; Agua destilada 1000 mL.

Caldo Extracto de Levadura-Sacarosa (YES): Extracto de levadura 20 gr; Sacarosa 150 gr; Agua destilada 1000 mL.

Caldo Dextrosa de Papa (PDB): Extracto de papa 4 gr (equivalente a 200 g de infusión de papas); glucosa 20 gr; Agua destilada 1000 mL.

Caldo Wickerham: Glucosa 40 gr; Peptona 5 gr; Extracto de levadura 3 gr; Extracto de malta 3 gr; Agua destilada 1000 mL.

b. Soluciones

Solución stock de rosa de bengala: se mezclaron 25 mg de rosa de bengala con 30 mL de etanol al 95% y se llevó a 100 mL con agua destilada.

Solución stock de dicloran: 200 mg de dicloran se llevaron a 100 mL con etanol.

Solución stock de cloranfenicol: 250 mg de cloranfenicol se disolvieron en 100 mL de etanol al 95%.

Solución Czapek concentrada: 0,01 g de $FeSO_4$ $7H_2O$, 3 g de NO_3Na , 0,5 g de ClK, 0,5 g de $MgSO_4 7H_2O$ se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Soluciones testigos de ocratoxina A: A patir de la toxina pura (ocratoxina A- Sigma Aldrich Co) se prepararon en metanol las soluciones de trabajo en concentraciones de 4,5 ng/mL, 7,5 ng/mL y 12,0 ng/mL.

Solución de dilución (PEG 1% + $NaHCO_3$ 5%): 10 g de PEG y 50 g de $NaHCO_3$ se disolvieronen en 1000 mL de agua calidad HPLC.

Solución de lavado (NaCl 2,5% + $NaHCO_3$ 0,5 %): 25 g de NaCl y 5 g de $NaHCO_3$ se disolvieron en 100 mL de agua calidad HPLC.

Fase móvil para el HPLC: Agua: Acetonitrilo: Acido acético (99:99:2, v/v/v). Se mezclaron 990 ml de agua con 990 ml de acetonitrilo y 20 ml de ácido acético glacial. La fase móvil se filtró con un filtro de tamaño de poro 0,45µm.

Solución EDTA 0,5 M: EDTA disódico 186,1 gr; Agua destilada 1000 mL (adicionar NaOH concentrado para ajustar el pH deseado).

Solución Tris-ClH 1M: Tris-base 121 gr; Agua destilada 1000 mL (adicionar HCL concentrado para ajustar el pH deseado).

c. Buffers

Buffer CTAB al 2%: EDTA 20 mL; Tris-ClH 50 mL; NaCl 40,9 gr; CTAB 2% 10 gr; Agua destilada 500 mL.

Buffer TE 1x: Tris-HCl 10 mL; EDTA 2 mL; Agua destilada 1000 mL.

Buffer TAE 50x: Tris-base 242 gr; EDTA 100 mL; CH_3COOH 57,1 mL; Agua destilada 1000 mL (diluir 50 veces para obtener el buffer 1x).

Buffer TBE 5x: Tris-base 54 gr; EDTA 20 mL; H_3BO_3 27,5 gr; Agua destilada 1000 mL (diluir 5 veces para obtener el buffer 1x).

Buffer OPA 10x: $(CH_3COO)_K$ 4,91 gr; $(CH_3COO)_{2Mg}$ 4 H_2O 2,14 gr; Tris-base 1,21 gr; Agua destilada 100 mL.

Buffer AFLP 10x: Tris-HCl 10 mL; KCl 3,72 gr; $MgCl_2$ 1,5 mL; Tritón 1% (v/v) 1 mL; Agua destilada 100 mL.

ANEXO II – Tablas y figuras

Materiales y Métodos

1. Muestreo

Tabla 1. Datos meteorológicos registrados durante el estadio de cuaje.

Vendimia	Región Vitivinícola	*T* max (°C)	*T* media (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	PP (mm)
2006/07	La Rioja - Valle de Famatina	36,8	28,0	21,0	52,6	184,4
	San Juan – Valle del Tulum	33,3	26,2	19,1	45,0	6,8
	Mendoza Noreste	32,2	26,1	18,5	37,0	3,0
	Mendoza – Valle de Uco	30,7	22,1	13,9	42,9	5,8
	Mendoza ZARM	28,6	22,4	16,1	45,0	59,2
	Mendoza Sur	32,5	22,8	14,6	45,5	39,1
	Río Negro - Neuquén	29,8	21,1	11,7	42,0	1,8
2007/08	La Rioja - Valle de Famatina	36,8	28,2	20,7	43,0	208,0
	San Juan – Valle del Tulum	32,7	25,2	17,8	47,0	20,8
	Mendoza Noreste	32,3	22,7	13,8	34,0	9,8
	Mendoza – Valle de Uco	30,0	21,0	12,3	36,9	57,2
	Mendoza ZARM	27,9	21,6	14,7	38,0	15,6
	Mendoza Sur	32,3	22,2	13,5	42,4	58,9
	Río Negro - Neuquén	30,1	22,0	13,0	36,0	-
2008/09	La Rioja - Valle de Famatina	35,3	28,1	20,4	43,6	48,0
	San Juan – Valle del Tulum	32,8	26,2	19,6	60,0	11,3
	Mendoza Noreste	32,6	23,3	16,9	53,1	18,2
	Mendoza – Valle de Uco	29,9	21,7	14,3	49,7	40,6
	Mendoza ZARM	27,5	22,1	16,2	50,0	36,2
	Mendoza Sur	31,4	22,2	14,7	53,7	60,5
	Río Negro - Neuquén	30,5	22,4	13,3	46,0	6,6
2009/10	La Rioja - Valle de Famatina	34,6	27,6	20,9	55,9	143,8
	San Juan – Valle del Tulum	32,0	25,4	18,9	52,0	6,0
	Mendoza Noreste	32,6	22,9	15,6	53,8	46,2
	Mendoza – Valle de Uco	29,0	20,9	13,0	54,2	18,6
	Mendoza ZARM	26,6	21,3	16,0	51,0	42,8
	Mendoza Sur	29,7	21,1	13,6	53,0	101,8
	Río Negro - Neuquén	28,4	20,4	11,1	43,0	0,2
2010/11	La Rioja - Valle de Famatina	37,1	30,2	19,9	45,6	51,0
	San Juan – Valle del Tulum	33,4	25,0	16,8	40,0	15,8
	Mendoza Noreste	33,1	23,0	16,1	42,9	48,2
	Mendoza – Valle de Uco	30,0	20,9	11,0	39,1	19,0
	Mendoza ZARM	28,5	22,2	15,3	35,0	41,0
	Mendoza Sur	32,6	22,7	13,6	40,4	27,9
	Río Negro - Neuquén	29,5	21,2	12,0	39,0	6,2

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones.

Tabla 2. Datos meteorológicos registrados durante el estadio de envero temprano.

Vendimia	Región Vitivinícola	*T* max (°C)	*T* media (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	PP (mm)
2006/07	La Rioja - Valle de Famatina	35,1	27,2	21,4	60,3	55,1
	San Juan – Valle del Tulum	33,9	27,2	20,5	55	16,6
	Mendoza Noreste	32,0	23,9	16,2	50,5	20,4
	Mendoza – Valle de Uco	31,0	22,8	15,3	50,9	45,4
	Mendoza ZARM	28,0	22,7	16,9	51,0	34,0
	Mendoza Sur	32,0	23,3	16,5	54,1	133,5
	Río Negro - Neuquén	31,2	22,8	14,1	46,0	27,0
2007/08	La Rioja - Valle de Famatina	35,5	28,5	21,8	52,8	160,2
	San Juan – Valle del Tulum	32,1	26,1	20,0	58	15,1
	Mendoza Noreste	32,4	23,7	15,8	48,5	82,8
	Mendoza – Valle de Uco	30,2	22,1	15,2	51,5	54,4
	Mendoza ZARM	27,8	22,2	16,8	53,0	77,8
	Mendoza Sur	32,2	23,1	15,8	52,8	39,6
	Río Negro - Neuquén	30,6	22,5	13,8	50,0	31,3
2008/09	La Rioja - Valle de Famatina	35,3	28,1	19,8	45,9	106,2
	San Juan – Valle del Tulum	33,5	25,9	18,4	58	19,4
	Mendoza Noreste	32,1	24,3	14,9	48,2	17,2
	Mendoza – Valle de Uco	30,7	21,6	13,8	48,4	55,0
	Mendoza ZARM	28,5	22,3	15,4	49	69,6
	Mendoza Sur	33,0	24,0	15,2	43,5	142,3
	Río Negro - Neuquén	32,5	23,7	13,6	44,0	3,2
2009/10	La Rioja - Valle de Famatina	36,7	29,7	22,4	48,2	37,0
	San Juan – Valle del Tulum	35,5	27,5	19,6	43,0	4,6
	Mendoza Noreste	34,2	25,2	13,5	46,9	18,0
	Mendoza – Valle de Uco	32,9	23,6	14,3	47,6	32,0
	Mendoza ZARM	30,9	24,2	17,3	39,0	29,8
	Mendoza Sur	34,3	24,7	16,2	42,4	105,2
	Río Negro - Neuquén	31,6	23,1	13,2	39,0	2,6
2010/11	La Rioja - Valle de Famatina	35,3	29,4	20,5	52,3	92,5
	San Juan – Valle del Tulum	33,0	25,9	18,8	52,0	54,0
	Mendoza Noreste	31,6	23,6	13,7	53,3	58,2
	Mendoza – Valle de Uco	31,2	23,7	12,8	47,2	7,6
	Mendoza ZARM	28,6	22,9	16,5	46,0	42,4
	Mendoza Sur	33,5	23,6	15,0	45,5	98,0
	Río Negro - Neuquén	30,2	22,2	13,3	47,0	18,2

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones.

Tabla 3. Datos meteorológicos registrados durante el estadio de envero tardío.

Vendimia	Región Vitivinícola	*T* max (°C)	*T* media (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	PP (mm)
2006/07	La Rioja - Valle de Famatina	35,4	27,6	21,5	53,1	24,1
	San Juan – Valle del Tulum	33,3	26,2	19,1	52,0	9,0
	Mendoza Noreste	31,3	22,3	14,5	46,6	2,8
	Mendoza – Valle de Uco	29,7	20,5	13,0	50,8	3,8
	Mendoza ZARM	27,3	21,1	15,1	51,0	14,8
	Mendoza Sur	30,4	21,6	14,5	54,8	48,3
	Río Negro - Neuquén	29,2	20,4	11.6	48,0	8,7
2007/08	La Rioja - Valle de Famatina	33,4	26,7	19,3	57,9	116,6
	San Juan – Valle del Tulum	31,6	24,9	18,3	57,0	43,0
	Mendoza Noreste	31,2	22,1	13,1	55,3	10,4
	Mendoza – Valle de Uco	29,3	20,8	13,7	60,0	34,6
	Mendoza ZARM	27,0	21,0	15,1	58,0	72,4
	Mendoza Sur	30,9	22,4	15,3	58,6	95,2
	Río Negro - Neuquén	31,4	22,9	14,4	55,0	8,5
2008/09	La Rioja - Valle de Famatina	35,8	28,5	20,7	43,3	9,9
	San Juan – Valle del Tulum	33,6	27,5	17,9	58,0	16,5
	Mendoza Noreste	32,7	23,8	13,5	45.3	1,2
	Mendoza – Valle de Uco	31,21	21,9	13,3	38,7	0,6
	Mendoza ZARM	28,8	23,0	16,6	39.0	0.0
	Mendoza Sur	33,1	23,1	14,6	44,5	31,2
	Río Negro - Neuquén	31,4	22,1	12,1	45,0	0,0
2009/10	La Rioja - Valle de Famatina	34,2	27,2	21,2	66,8	123,9
	San Juan – Valle del Tulum	32,6	26,2	19,9	55,0	1,8
	Mendoza Noreste	31,2	23,3	15,2	61,7	5,2
	Mendoza – Valle de Uco	29,6	21,8	14,1	63,3	24,8
	Mendoza ZARM	27,3	22,0	16,7	56,0	1,8
	Mendoza Sur	30,9	22,6	16,2	57,1	34,0
	Río Negro - Neuquén	28,5	20,0	10,7	48,0	3,6
2010/11	La Rioja - Valle de Famatina	31,6	26,3	19,2	65,7	170,9
	San Juan – Valle del Tulum	30,6	24,2	17,8	59,0	28,4
	Mendoza Noreste	28,6	21,7	15,3	63,6	60,8
	Mendoza – Valle de Uco	27,9	21,0	12,8	61,3	66,5
	Mendoza ZARM	25,9	20,5	15,2	58,0	36,8
	Mendoza Sur	30,4	21,9	14,5	55,6	34,3
	Río Negro - Neuquén	30,0	21,6	12,5	49,0	5,8

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones.

Tabla 4. Datos meteorológicos registrados durante el estadio de madurez.

Vendimia	Región Vitivinícola	*T* max (°C)	*T* media (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	PP (mm)
2006/07	La Rioja - Valle de Famatina	30,5	23,2	18,1	65,7	47,8
	San Juan – Valle del Tulum	29,4	23,1	16,8	61,0	11,7
	Mendoza Noreste	23,5	19,4	12,6	58,8	42,2
	Mendoza – Valle de Uco	22,4	17,9	11,6	64,3	107,8
	Mendoza ZARM	23,8	18,2	12,8	64,0	106,4
	Mendoza Sur	26,5	18,7	12,2	62,9	154,4
	Río Negro - Neuquén	25,6	17,4	9,7	63,0	30,5
2007/08	La Rioja - Valle de Famatina	29,8	23,9	18,6	67,8	137,2
	San Juan – Valle del Tulum	27,9	22,5	17,1	64,0	40,0
	Mendoza Noreste	25,3	19,9	13,4	58,7	35,2
	Mendoza – Valle de Uco	24,2	18,1	12,9	66,7	44,6
	Mendoza ZARM	24,0	18,5	13,7	66,0	49,8
	Mendoza Sur	27,2	19,2	13,1	62,8	52,8
	Río Negro - Neuquén	27,7	18,7	9,9	57,0	5,1
2008/09	La Rioja - Valle de Famatina	33,1	26,4	18,8	53,9	73,9
	San Juan – Valle del Tulum	31,7	24,5	17,3	61,0	12,5
	Mendoza Noreste	27,2	22,0	15,3	56,5	24,6
	Mendoza – Valle de Uco	26,8	20,4	14,2	54,8	12,8
	Mendoza ZARM	27,2	21,2	14,3	50,0	25,6
	Mendoza Sur	31,4	21,9	13,6	47,3	26,2
	Río Negro - Neuquén	28,8	19,5	10,0	53,0	0,2
2009/10	La Rioja - Valle de Famatina	33,7	27,0	19,7	60,2	39,1
	San Juan – Valle del Tulum	31,3	24,5	17,8	56,0	0,0
	Mendoza Noreste	27,2	21,9	16,1	63,9	27,2
	Mendoza – Valle de Uco	26,8	20,4	15,4	63,3	13,0
	Mendoza ZARM	26,2	20,5	15,0	58,0	41,4
	Mendoza Sur	31,0	22,0	14,3	54,3	4,6
	Río Negro - Neuquén	27,3	19,3	11,7	59,0	8,0
2010/11	La Rioja - Valle de Famatina	29,6	24,5	16,3	61,5	147,0
	San Juan – Valle del Tulum	29,1	22,0	14,9	58,0	9,4
	Mendoza Noreste	24,9	19,1	13,2	65,1	27,4
	Mendoza – Valle de Uco	24,1	18,7	12,4	60,4	23,5
	Mendoza ZARM	24,4	18,6	12,9	57,0	20,2
	Mendoza Sur	28,5	19,5	11,8	53,4	38,3
	Río Negro - Neuquén	26,9	17,7	8,3	53,0	1,6

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: precipitaciones.

Tabla 5. Precipitaciones acumuladas durante los estadios de cuaje, envero temprano, envero tardío y madurez.

Región Vitivinícola	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11
La Rioja - Valle de Famatina	311,4	622,0	238,0	343,8	461,4
San Juan – Valle del Tulum	44,1	118,9	59,7	12,4	107,6
Mendoza Noreste	68,4	138,2	61,2	96,6	194,6
Mendoza – Valle de Uco	162,8	190,8	109,0	88,4	116,6
Mendoza ZARM	214,4	215,6	131,4	115,8	140,4
Mendoza Sur	375,3	246,5	260,2	245,6	198,5
Río Negro - Neuquén	68,0	44,9	10,0	14,4	31,8

Tabla 6. Humedad relativa acumulada durante los estadios de cuaje, envero temprano, envero tardío y madurez.

Región Vitivinícola	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11
La Rioja - Valle de Famatina	231,7	221,5	186,7	231,1	225,1
San Juan – Valle del Tulum	213,0	226,0	237,0	206,0	209,0
Mendoza Noreste	192,9	196,5	157,8	226,3	224,9
Mendoza – Valle de Uco	208,9	215,1	191,6	228,4	208,0
Mendoza ZARM	211,0	215,0	149,0	204,0	196,0
Mendoza Sur	217,3	216,6	189,0	206,8	194,9
Río Negro - Neuquén	199,0	198,0	188,0	189,0	188,0

Tabla 7. Temperatura media acumulada durante los estadios de cuaje, envero temprano, envero tardío y madurez.

Región Vitivinícola	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11
La Rioja - Valle de Famatina	106,0	107,3	111,1	111,5	110,4
San Juan – Valle del Tulum	102,7	98,7	104,1	103,6	97,1
Mendoza Noreste	91,7	88,4	93,4	93,3	87,4
Mendoza – Valle de Uco	83,3	82,0	85,6	86,7	84,3
Mendoza ZARM	84,4	83,3	88,6	88,0	84,2
Mendoza Sur	86,4	86,9	91,2	90,4	87,7
Río Negro - Neuquén	81,7	86,1	87,7	82,8	82,7

3. Identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* potencialmente ocratoxigénicas.

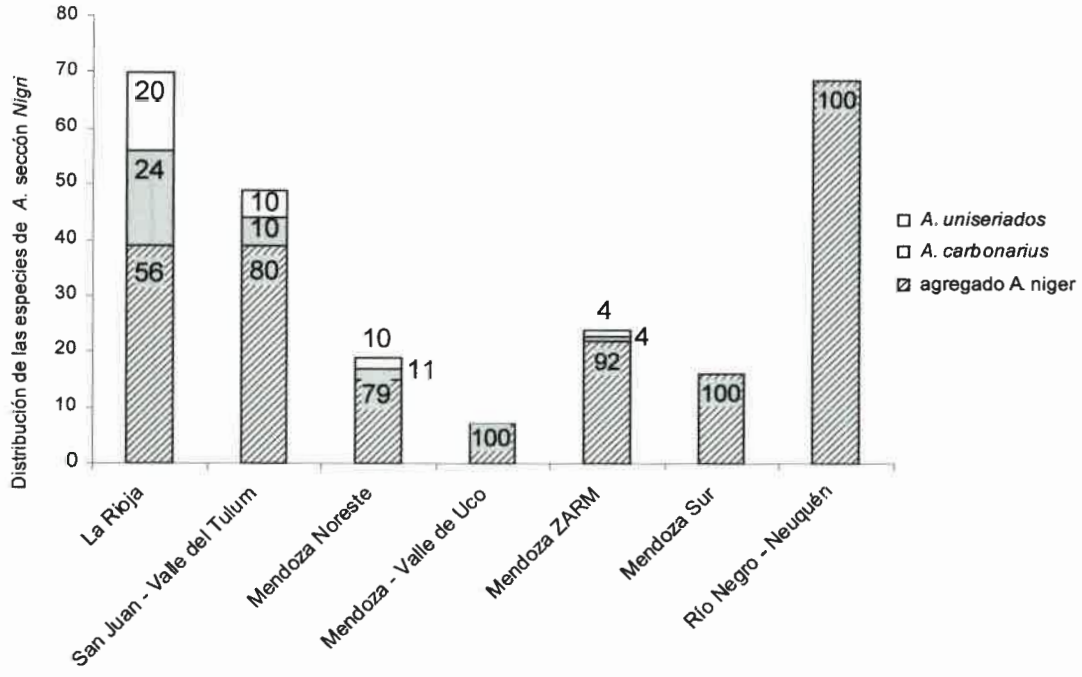


Figura 1. Número de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2006/07 (los valores indicados sobre las barras se refieren a la frecuencia de aislamiento de las distintas especies en cada región).

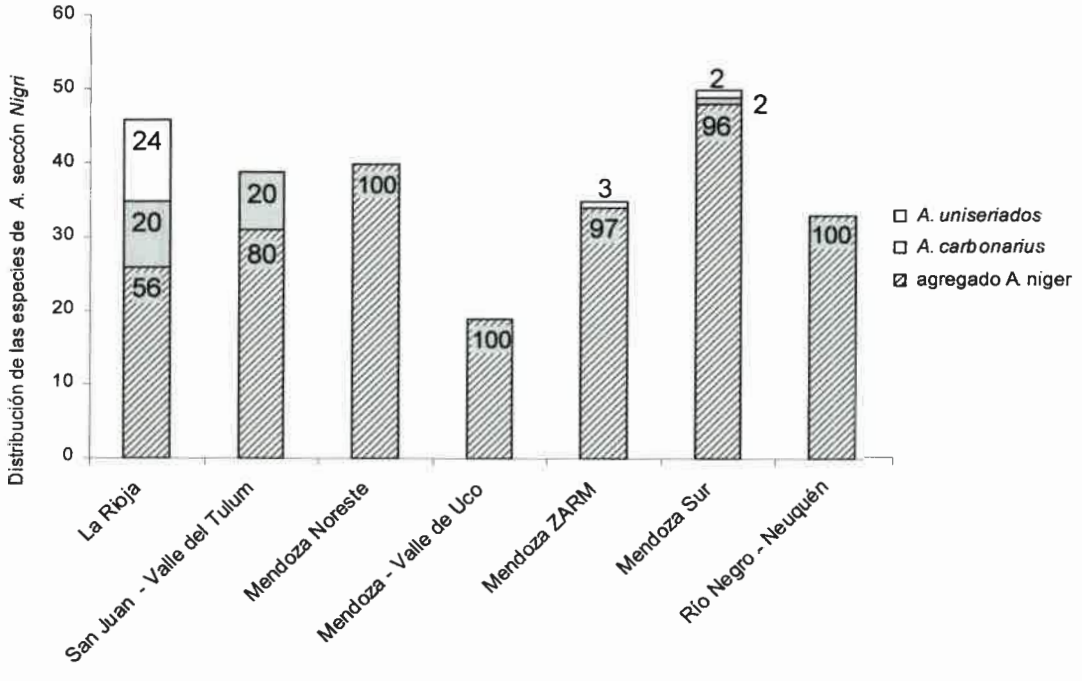


Figura 2. Número de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2007/08 (los valores indicados sobre las barras se refieren a la frecuencia de aislamiento de las distintas especies en cada región).

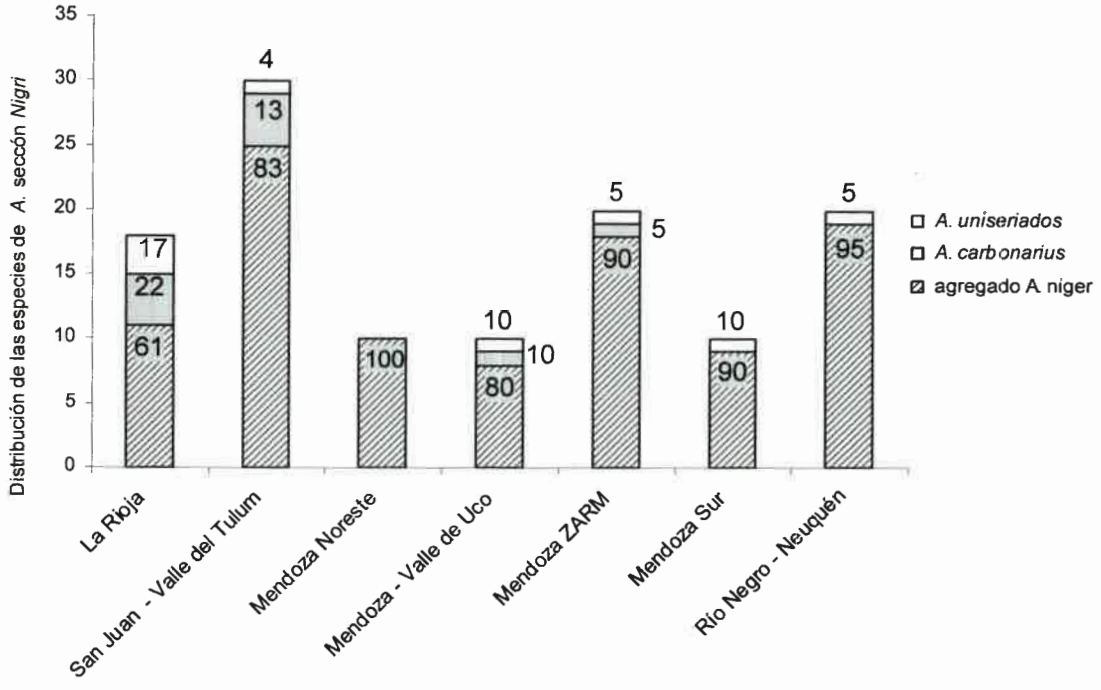


Figura 3. Número de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2008/09 (los valores indicados sobre las barras se refieren a la frecuencia de aislamiento de las distintas especies en cada región).

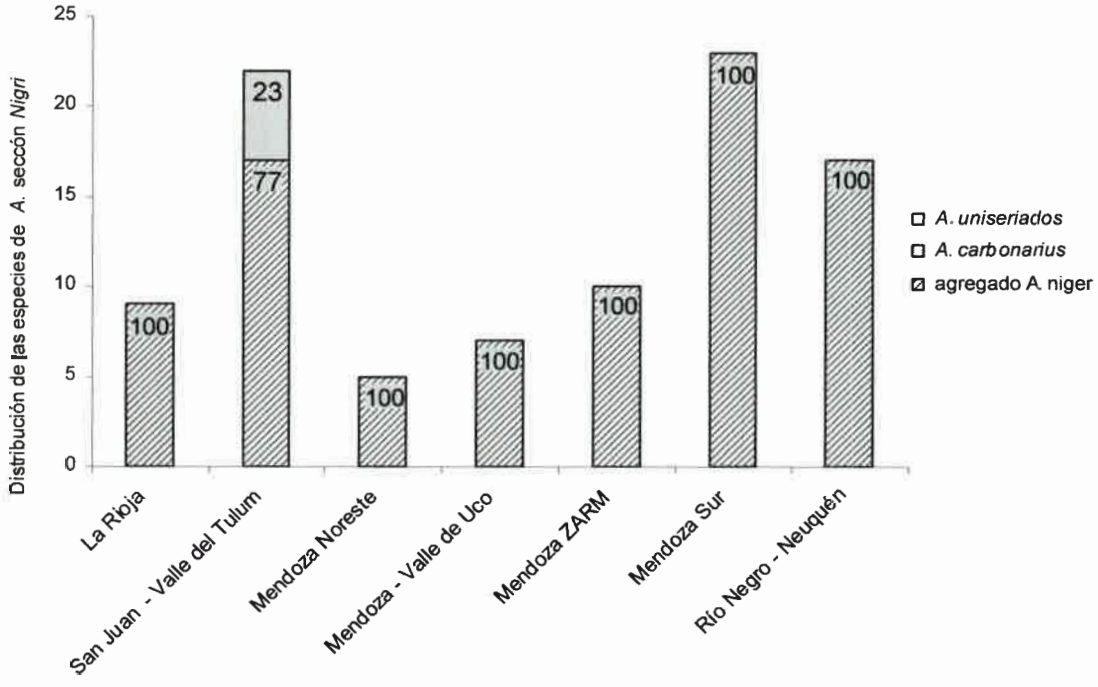


Figura 4. Número de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2009/10 (los valores indicados sobre las barras se refieren a la frecuencia de aislamiento de las distintas especies en cada región).

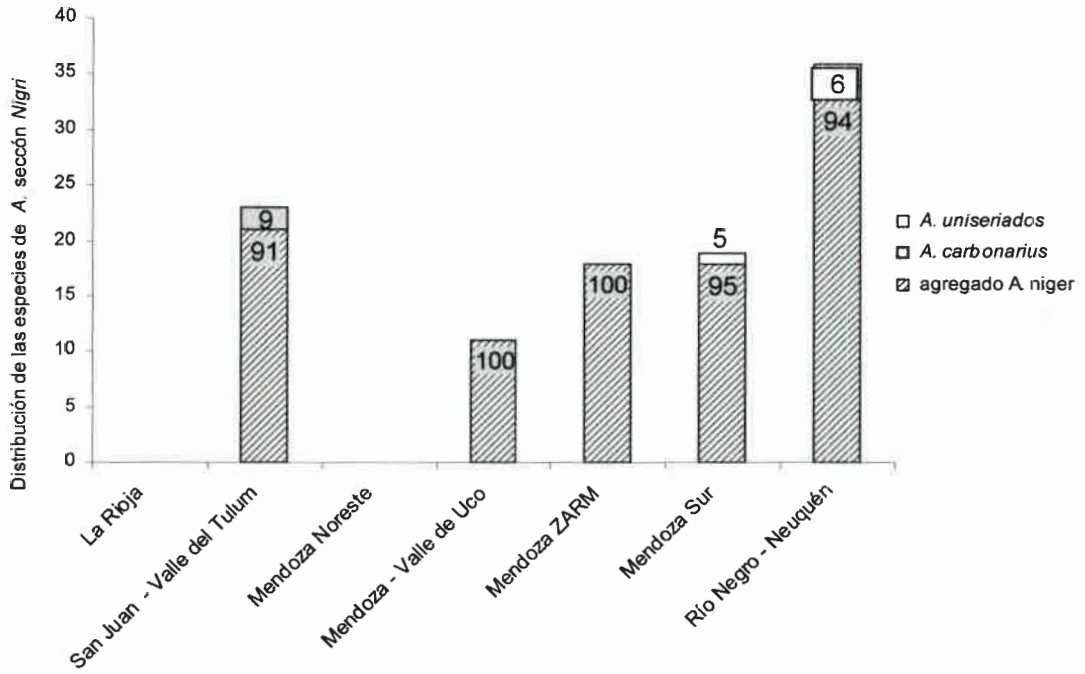


Figura 5. Número de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas en las distintas regiones vitivinícolas durante la vendimia 2010/11 (los valores indicados sobre las barras se refieren a la frecuencia de aislamiento de las distintas especies en cada región).

ANEXO III – Estadística

Resultados y discusión

2. *Aspergillus* de la sección *Nigri* en uvas.

Tabla 1. Análisis de la varianza sobre rangos de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina, durante la vendimia 2006/07.

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Rango de datos	43	0,37	0,26	48,8

Fuente	G	CM	F	p-valor
Regiones	6	406,1	3,52	0,0077
Error	36	115,5		
Total	42			

Tabla 2. Análisis de la varianza sobre rangos de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina, durante la vendimia 2007/08.

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Rango de datos	38	0,53	0,44	42,6

Fuente	G	CM	F	p-valor
Regiones	6	402,1	5,82	0,0004
Error	31	69,1		
Total	37			

Tabla 3. Análisis de la varianza sobre rangos - Kruskal-Wallis de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina, durante la vendimia 2008/09.

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Rango de datos	34	0,11	0,0	59,2

Fuente	G	CM	F	p-valor
Regiones	6	59,3	0,55	0,7636
Error	27	107,4		
Total	33			

Tabla 4. Análisis de la varianza sobre rangos de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina, durante la vendimia 2009/10.

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Rango de datos	14	0,71	0,47	40,5

Fuente	G	CM	F	p-valor
Regiones	6	26,8	2,9	0,0457
Error	7	9,2		
Total	13			

Tabla 5. Análisis de la varianza sobre rangos de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas cosechadas en las regiones vitivinícolas de Argentina, durante la vendimia 2010/11.

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Rango de datos	21	0,40	0,14	51,6

Fuente	G	CM	F	p-valor
Regiones	6	49,7	1,54	0,0235
Error	14	32,2		
Total	20			

Tabla 6. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante el cuaje y la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* (Coeficiente de Pearson).

Vendimia	*T* max (°C)	*T* med (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	Prec (mm)
2006/07	-	-	-	-	-
2007/08	-	0,70	0,69	-	-
2008/09	-	-	-	-	-
2009/10	-	-	-	-	-
2010/11	-	0,78	0,78	-	-

T: temperatura, max: máxima, med: media, min: mínima, HR: humedad relativa, Prec: precipitaciones.

Tabla 7. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante envero temprano y la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* (Coeficiente de Pearson).

Vendimia	*T* max (°C)	*T* med (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	Prec (mm)
2006/07	-	-	-	-	-
2007/08	-	0,71	0,64	-	-
2008/09	-	0,62	-	-	-
2009/10	-	-	-	-	0,76*
2010/11	-	-	0,80	0,80	-

T: temperatura, max: máxima, med: media, min: mínima, HR: humedad relativa, Prec: precipitaciones. * Correlación significativa con p<0,05.

Tabla 8. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante envero tardío y la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* (Coeficiente de Pearson).

Vendimia	*T* max (°C)	*T* med (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	Prec (mm)
2006/07	-	-	-	-	-
2007/08	-	0,71	-	-	-
2008/09	-	-	-	-	-
2009/10	-	-	-	-	-
2010/11	-	0,75	0,75	-	-

T: temperatura, max: máxima, med: media, min: mínima, HR: humedad relativa, Prec: precipitaciones.

Tabla 9. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante madurez y la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Nigri* (Coeficiente de Pearson).

Vendimia	*T* max (°C)	*T* med (°C)	*T* min (°C)	HR (%)	Prec (mm)
2006/07	-	-	-	-	- 0,69
2007/08	-	0,75*	0,62	-	-
2008/09	-	-	-	-	-
2009/10	-	-	-	-0,74*	-
2010/11	-	0,63	-	-	-0,65

T: temperatura, max: máxima, med: media, min: mínima, HR: humedad relativa, Prec: precipitaciones.

* Correlación significativa con p<0,05

3. Identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* potencialmente ocratoxigénicas.

Tabla 10. Análisis de la varianza sobre rangos – Kruskal Wallis de los porcentajes de aislamiento del agregado *Aspergillus niger* en uvas durante las vendimias 2006/07, 2007/08, 2009/10, 2010/11.

Vendimia	Estadístico H	p-valor
2006/07	19,44	0,003
2007/08	19,54	0,003
2009/10	19,92	0,003
2010/11	18,86	0,004

Comparaciones múltiples (Test de Tuckey):

Vendimia	Comparaciones	Diferencia de rangos	q	p-valor
2006/07	MU*LR	45,0	4,2	p<0,05
2006/07	MS*LR	45,0	4,2	p<0,05
2006/07	RN+LR	45,0	4,2	p<0,05
2007/08	NR*LR	45,0	4,2	p<0,05
2007/08	MN*LR	45,0	4,2	p<0,05
2007/08	MU*LR	45,0	4,2	p<0,05
2010/11	MU*MN	45,0	4,2	p<0,05
2010/11	MU*LR	45,0	4,2	p<0,05
2010/11	MZ*MN	45,0	4,2	p<0,05
2010/11	MZ*LR	45,0	4,2	p<0,05

En la tabla solo se agregaron las comparaciones con diferencias significativas.

Tabla 11. Análisis de la varianza de los porcentajes de aislamiento del agregado *Aspergillus niger* en uvas cosechadas durante la vendimia 2008/09.

Fuente	G	CM	F	p-valor
Regiones	6	485,6	59,4	<0,001
Error	14	8,2		
Total	20			

Comparaciones múltiples (Test de Tuckey):

Vendimia	Comparaciones	Diferencia de rangos	q	p-valor
2008/09	MN*LR	38,9	23,6	p<0,001
2008/09	MN*MU	20,0	12,1	p<0,001
2008/09	MN*SJ	16,7	10,1	p<0,001
2008/09	MN*MS	10,0	6,0	p<0,05
2008/09	MN*MZ	10,0	6,0	p<0,05
2008/09	RN*LR	33,9	20,5	p<0,001
2008/09	RN*MU	15,0	9,0	p<0,001
2008/09	RN*SJ	11,7	7,1	p<0,05
2008/09	MZ*LR	28,9	17,5	p<0,001
2008/09	MZ*MU	10,0	6,0	p<0,05
2008/09	MS*LR	28,9	17,5	p<0,001
2008/09	MS*MU	10,0	6,0	p<0,05
2008/09	SJ*LR	22,2	13,4	p<0,001

En la tabla sólo se agregaron las comparaciones con diferencias significativas.

Tabla 12. Análisis de la varianza sobre rangos – Kruskal Wallis de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus carbonarius* en uvas durante las vendimias 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10, 2010/11.

Vendimia	Estadístico H	p-valor
2006/07	19,44	0,003
2007/08	19,73	0,003
2008/09	19,32	0,004
2009/10	19,92	0,003
2010/11	19,86	0,003

Comparaciones múltiples (Test de Tuckey):

Vendimia	Comparaciones	Diferencia de rangos	q	p-valor
2006/07	LR*NR	45,0	4,12	p<0,05
2006/07	LR*MS	45,0	4,12	p<0,05
2006/07	LR*MU	45,0	4,12	p<0,05
2008/09	LR*NR	45,0	4,12	p<0,05
2008/09	LR*MS	45,0	4,12	p<0,05
2008/09	LR*MN	45,0	4,12	p<0,05

En la tabla sólo se agregaron las comparaciones con diferencias significativas.

Tabla 13. Análisis de la varianza sobre rangos – Kruskal Wallis de los porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* uniseriados en uvas durante las vendimias 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10, 2010/11.

Vendimia	Estadístico H	p-valor
2006/07	19,40	0,004
2007/08	19,43	0,004
2008/09	19,04	0,004
2009/10	0	1,000
2010/11	19,35	0,004

Comparaciones múltiples (Test de Tuckey):

Vendimia	Comparaciones	Diferencia de rangos	q	p-valor
2006/07	LR*NR	45,0	4,12	p<0,05
2006/07	LR*MS	45,0	4,12	p<0,05
2006/07	LR*MU	45,0	4,12	p<0,05
2008/09	LR*MN	54,0	5,02	p<0,05
2008/09	LR*SJ	45,0	4,12	p<0,05

En la tabla sólo se agregaron las comparaciones con diferencias significativas.

6. Influencia de los factores ambientales sobre la incidencia de las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri.*

Tabla 14. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante el estadio de cuaje y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri.*

Parámetros meteorológicos	agregado *A. niger*	*A. carbonarius*	*A.* uniseriados
T máxima (°C)	- 0,69 (06/07)	0,69 (06/07)	0,65 (06/07)
	- 0,76 (07/08)*	0,77 (07/08)*	0,63 (07/08)
	-	-	-
	-0,75 (09/10)*	0,75 (09/10)*	-
	-	-	-
T media (°C)	- 0,93 (06/07)*	0,93 (06/07)*	0,92 (06/07)*
	- 0,93 (07/08)*	0,90 (07/08)*	0,72 (07/08)
	- 0,57 (08/09)	0,68 (08/09)	-
	- 0,91 (09/10)*	0,91 (09/10)*	-
	-	0,54 (10/11)	-
T minima (°C)	-0,96 (06/07)**	0,96 (06/07)**	0,96 (06/07)**
	- 0,97 (07/08)**	0,90 (07/08)*	0,74 (07/08)*
	-	0,70 (08/09)	-
	- 0,82 (09/10)*	0,82 (09/10)	-
	-	-	-
HR (%)	-	-	-
	- 0,80 (07/08)*	0,89 (07/08)*	-
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
PP (mm)	- 0,62 (06/07)	0,63 (06/07)	0,57 (06/07)
	- 0,76 (07/08)*	0,60 (07/08)	0,90 (07/08)*
	- 0,47 (08/09)	-	0,65 (08/09)
	- 0,65 (09/10)	0,65 (09/10)	-
	0,78 (10/11)	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: Precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

Tabla 15. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante el estadio de envero temprano y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Parámetros meteorológicos	agregado *A. niger*	*A. carbonarius*	*A.* uniseriados
T máxima (°C)	- 0,56 (06/07)	0,55 (06/07)	0,52 (06/07)
	- 0,66 (07/08)	0,70 (07/08)	0,55 (07/08)
	- 0,37 (08/09)	-	-
	- 0,75 (09/10)*	0,75 (09/10)*	-
	-	-	-
T media (°C)	- 0,80 (06/07)*	0,80 (06/07)*	0,79 (06/07)*
	- 0,92 (07/08)*	0,92 (07/08)*	0,68 (07/08)
	- 0,43 (08/09)	0,44 (08/09)	-
	- 0,92 (09/10)*	0,92 (09/10)*	-
	-	0,43 (10/11)	-)
T minima (°C)	- 0,83 (06/07)*	0,84 (06/07)*	0,82 (06/07)*
	- 0,96 (07/08)**	0,91 (07/08)*	0,69 (07/08)
	- 0,64 (08/09)	0,73 (08/09)	-
	- 0,87 (09/10)*	0,87 (09/10)*	-
	-	0,43 (10/11)	-
HR (%)	- 0,68 (06/07)	0,69 (06/07)	0,65 (06/07)
	- 0,63 (07/08)*	0,74 (07/08)*	-
	-	0,48 (08/09)	-
	- 0,48 (09/10)	0,48 (09/10)	-
	- 0,63 (10/11)	0,80 (10/11)	-
PP (mm)	-	-	-
	- 0,51(07/08)	-	0,85 (07/08)*
	- 0,48 (08/09)	-	0,67 (08/09)
	-	-	-
	-	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: Precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

Tabla 16. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante el estadio de envero tardío y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Parámetros meteorológicos	agregado *A. niger*	*A. carbonarius*	*A.* uniseriados
T máxima (°C)	-0,73 (06/07)	0,73 (06/07)	0,70 (06/07)
	- 0,54 (07/08)	0,64 (07/08)	-
	- 0,42 (08/09)	-	-
	- 0,79 (09/10)*	0,78 (09/10)*	-
	- 0,59 (10/11)	0,61 (10/11)	-
T media (°C)	- 0,85 (06/07)*	0,86 (06/07)*	0,84 (06/07)*
	- 0,89 (07/08)*	0,90 (07/08)*	0,62 (07/08)
	-0,56 (08/09)	0,69 (08/09)	-
	- 0,85 (09/10)*	0,84 (09/10)*	-
	- 0,62 (10/11)	0,93 (10/11)*	-
T minima (°C)	-0,86 (06/07)*	0,87 (06/07)*	0,84 (06/07)*
	- 0,97 (07/08)**	0,95 (07/08)**	0,67 (07/08)
	- 0,71 (08/09)	0,79 (08/09)*	0,44 (08/09)
	- 0,76 (09/10)*	0,76 (09/10)*	-
	-	0,41 (10/11)	-
HR (%)	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
	- 0,53 (09/10)	0,53 (09/10)	-
	0,56 (10/11)	-	-
PP (mm)	-	-	-
	- 0,73 (07/08)	0,53 (07/08)	0,86 (07/08)*
	-	-	-
	- 0,88 (09/10)*	0, 88 (09/10)*	0,64 (09/10)
	-	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: Precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

Tabla 17. Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante el estadio de madurez y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* .

Parámetros meteorológicos	agregado *A. niger*	*A. carbonarius*	*A.* uniseriados
T máxima (°C)	- 0,58 (06/07)	0,59 (06/07)	0,56 (06/07)
	- 0,73 (07/08)	0,77 (07/08)*	0,53 (07/08)
	- 0,59 (08/09)	-	0,52 (08/09)
	- 0,82 (09/10)*	0,82 (09/10)*	-
	-0,53 (10/11)	0,61 (10/11)	-
T media (°C)	- 0,84 (06/07)*	0,84 (06/07)*	0,83 (06/07)*
	- 0,92 (07/08)*	0,94 (07/08)**	0,61 (07/08)
	- 0,59 (08/09)	0,68 (08/09)	-
	- 0,91 (09/10)*	0,91 (09/10)*	-
	-	0,48 (10/11)	-
T minima (°C)	- 0,86 (06/07)*	0,86 (06/07)*	0,85 (06/07)*
	- 0,92 (07/08)*	0,88 (07/08)**	0,64 (07/08)
	- 0,54 (08/09)	0,76 (08/09)*	-
	- 0,80 (09/10)*	0,80 (09/10)*	-
	-	-	-
HR (%)	-	-	-
	- 0,58 (07/08)	-	0,58 (07/08)
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
PP (mm)	- 0,54 (06/07)	0,54 (06/07)	-
	- 0,82 (07/08)*	0,63 (07/08)	0,94 (07/08)**
	- 0,57 (08/09)	0,54 (08/09)	0,47 (08/09)
	-	-	-
	-	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa, PP: Precipitaciones. * Correlación significativa con p<0,05; ** Correlación significativa con p< 0,001.

Tabla 18. . Correlación entre los parámetros meteorológicos registrados durante todas las vendimias y la frecuencia de aislamiento de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* .

Estadío	Parámetros meteorológicos	agregado *A. niger*	*A. carbonarius*	*A.* uniseriados
Cuaje	*T* máxima (°C)	- 0,58 **	0,54 **	0,42 *
	T media (°C)	- 0,78 **	0,74 **	0,54 **
	T minima (°C)	- 0,76 **	0,72 **	0,52 **
	HR (%)	-	-	0,49 *
	PP (mm)	- 0,56 *	-	0,44 *
E. temprano	*T* máxima (°C)	0,53 **	0,54 **	-
	T media (°C)	- 0,73 **	0,74 **	-
	T minima (°C)	- 0,75 **	0,74 **	-
	HR (%)	-	-	-
	PP (mm)	-	-	-
Envero tardío	*T* máxima (°C)	-0,63 **	0,56 **	0,49 *
	T media (°C)	- 0,74 **	0,70 **	0,47 *
	T minima (°C)	- 0,73 **	0,72 **	0,38 *
	HR (%)	-	-	- 0,46 *
	PP (mm)	- 0,43 *	0,44 *	-
Madurez	*T* máxima (°C)	- 0,61**	0,58**	-
	T media (°C)	- 0,74**	0,73**	-
	T minima (°C)	- 0, 66**	0,66**	-
	HR (%)	-	-	-
	PP (mm)	-	-	-

E: envero, *T*: temperatura, HR: humedad relativa, PP: Precipitaciones. * Correlación significativa con $p<0,05$; ** Correlación significativa con $p< 0,001$.

Tabla 19. Correlación entre los parámetros meteorológicos acumulados y la frecuencia de aislamiento del agregado *Aspergillus niger* (Coeficiente de Pearson).

Vendimias	*T* media	HR (%)	Precipitaciones (mm)
2006/07	-0,88*	-	-
2007/08	-0,93*	-0,74*	-0,76*
2008/09	-0,55	-	-0,54
2009/10	-0,90*	-0,44	-0,63
2010/11	-	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa. * Correlación significativa con p<0,05.

Tabla 20. Correlación entre los parámetros meteorológicos acumulados y la frecuencia de aislamiento del agregado *Aspergillus carbonarius* (Coeficiente de Pearson).

Vendimias	*T* media	HR (%)	Precipitaciones (mm)
2006/07	0,88*	-	-
2007/08	0,93*	0,73*	0,55
2008/09	0,64	-	-
2009/10	0,90*	0,44	0,62
2010/11	0,48	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa. * Correlación significativa con p<0,05.

Tabla 21. Correlación entre los parámetros meteorológicos acumulados y la frecuencia de aislamiento del agregado *Aspergillus* uniseriados(Coeficiente de Pearson).

Vendimias	*T* media	HR (%)	Precipitaciones (mm)
2006/07	0,87*	-	-
2007/08	0,67	-	0,96**
2008/09	-	-	0,66
2009/10	-	-	-
2010/11	-	-	-

T: temperatura, HR: humedad relativa. * Correlación significativa con p<0,05; ** Correlación significativa con p< 0,001.

8. Efecto de Planococcus ficus sobre la incidencia de *Aspergillus* sección *Nigri* y los niveles de ocratoxina A en uvas.

Tabla 22. Análisis de la varianza de los porcentajes de aislamiento de los diferentes géneros fúngicos aislados de uvas dañadas e intactas cosechadas durante la vendimia 2006/07.

Variedad	Fuente	G	CM	F	p-valor
Merlot	*Asp*D * *Asp*ND	1	5478,0	29,1	<0,001
	*Alt*D * *Alt*ND	1	708,0	7,5	0,013
	*Cla*D*Cla*ND	1	68,4	12,3	0,003
Malbec	*Alt*D * *Alt*ND	1	2928,2	31,6	<0,001
C. Sauvignon	*Asp*D * *Asp*ND	1	296,4	17,5	<0,001
	*Alt*D * *Alt*ND	1	756,4	11,2	0,004
	*Lev*D * *Lev*ND	1	1344,8	18,1	<0,001

Asp: *Aspergillus*, Alt: *Alternaria*, Cla: *Cladosporium*, Lev: *levaduras*.
D: dañadas, ND: no dañadas.

Tabla 23. Análisis de la varianza sobre rangos – Kruskal Wallis de diferentes géneros fúngicos aislados de uvas dañadas e intactas cosechadas durante la vendimia 2006/07.

Variedad	Fuente	Estadístico H	p-valor
Merlot	*Fus*D*Fus*ND	5,58	0,018
	*Tric*D*Trich*ND	5,96	0,015
	*Lev*D * *Lev*ND	14,46	<0,001
	*Pen*D*Pen*ND	16,35	<0,001
Malbec	*Asp*D * *Asp*ND	13,19	<0,001
	*Lev*D * *Lev*ND	14,42	<0,001
	*Pen*D*Pen*ND	17,13	<0,001
C. Sauvignon	*Pen*D*Pen*ND	16,32	<0,001
	*Fus*D*Fus*ND	13,91	<0,001

Comparaciones múltiples (Test de Tuckey):

Variedad	Comparaciones	Diferencia de rangos	q	p-valor
Merlot	*Fus*D**Fus*ND	53	2,8	<0,05
	*Tric*D**Trich*ND	55	2,9	<0,05
	*Lev*D * *Lev*ND	100	5,3	<0,05
	*Pen*D**Pen*ND	100	5,3	<0,05
Malbec	*Asp*D * *Asp*ND	96	5,1	<0,05
	*Lev*D * *Lev*ND	100	5,3	<0,05
	*Pen*D**Pen*ND	100	5,3	<0,05
C. Sauvignon	*Pen*D**Pen*ND	100	5,3	<0,05
	*Fus*D**Fus*ND	90	4,8	<0,05

En la tabla sólo se agregaron las comparaciones con diferencias significativas.

Tabla 23. Análisis de la varianza sobre rangos – Kruskal Wallis de diferentes géneros fúngicos aislados de uvas dañadas e intactas cosechadas durante la vendimia 2008/09.

Variedad	Fuente	Estadístico H	p-valor
Malbec	*Alt*D * *Alt*ND	16,33	<0,001
	*Asp*D * AspND	14,30	<0,001
	*Lev*D * *Lev*ND	16,32	<0,001
	*Pen*D**Pen*ND	13,97	<0,001
C. Sauvignon	*Alt*D * *Alt*ND	19,00	<0,001
	*Asp*D * *Asp*ND	19,00	<0,001

Comparaciones múltiples (Test de Tuckey):

Variedad	Comparaciones	Diferencia de rangos	q	p-valor
Malbec	*Alt*D * *Alt*ND	100	5,3	<0,05
	*Asp*D * AspND	100	5,3	<0,05
	*Lev*D * *Lev*ND	100	5,3	<0,05
	*Pen*D**Pen*ND	90	4,8	<0,05
C. Sauvignon	*Alt*D * *Alt*ND	100	5,3	<0,05
	*Asp*D * *Asp*ND	100	5,3	<0,05

En la tabla sólo se agregaron las comparaciones con diferencias significativas.

PAPERS

International Journal of Food Microbiology 136 (2009) 137–141

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Short communication

Aspergillus section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina

M.L. Chiotta [a], M.L. Ponsone [a], M. Combina [b,1], A.M. Torres [a,1], S.N. Chulze [a,*,1]

[a] Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina
[b] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 July 2009
Accepted 8 August 2009

Keywords:
Aspergillus section *Nigri*
Ochratoxin A
Grapes

ABSTRACT

Vineyards located in eight grape growing regions of Argentina during the harvest season 2006/07 were evaluated. The aims of this study were to determine the incidence of *Aspergillus* section *Nigri*, their ability to produce ochratoxin A (OTA) and to evaluate the OTA natural occurrence in grapes. Bunches of grapes at maturation stage were collected, and grapes (50 per sample) were plated on Petri dishes containing dichloran-glycerol 18% agar (DG18) and dichloran-rose bengal-chloramphenicol agar (DRBC) media. After an incubation period of 7 days at 25 °C, the mycoflora belonging to *Aspergillus* section *Nigri* was identified. OTA occurrence and the toxicogenic ability of the strains were analyzed by HPLC. *A. niger* aggregate strains were dominant showing the highest infection percentage (81%), followed by *A. carbonarius* (11%) and *Aspergillus* uniseriate (8%). *A. carbonarius* strains presented the highest percentage of OTA-producer strains (82%) and the highest toxin levels (mean 202 ng/g). A positive correlation between the isolation percentage of *A. carbonarius* in grapes and temperature was found. The warmest regions showed the highest *A. carbonarius* incidence. OTA was detected at low levels in grapes during the survey. OTA levels in grapes and rain at harvest time correlated positively.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by species belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Its occurrence has been reported in a wide variety of foods and beverages. Grapes and their derived products as grape juice, dry vine fruits and wine, are frequently contaminated with this toxin (Majerus and Otteneder, 1996; Zimmerli and Dick, 1996). OTA has been shown to have nephrotoxic, immunotoxic, genotoxic, neurotoxic and teratogenic properties. The IARC has classified OTA as a possible human carcinogen, group 2B (IARC, 1993). Based on the available scientific toxicological and exposure data, the European Union established 2 μg/kg as maximum permitted level for OTA in wines (European commission, 2006).

The fungal species responsible for OTA contamination in grapes belong to *Aspergillus* section *Nigri*, which are always present in vineyards and can be isolated from grapes starting from the early stages of the berry development even if their incidence is more relevant in early veraison (Battilani et al., 2003a). Within this section, *Aspegillus carbonarius* has been identified as the main source of OTA contamination and accumulation in grapes and wines in Europe (Battilani et al., 2006a; Bejaoui et al., 2006; Bellí et al., 2006; Serra et al., 2006b) and its incidence increased from ripening to harvest, when vineyard relative humidity usually increased, with high risk of OTA accumulation always associated with hot temperatures (Cozzi et al., 2007). Several studies have demonstrated that climatic conditions affect the contamination severity depending on the years and field location (Bellí et al., 2005a; Battilani et al., 2006b; Leong et al., 2006a).

Argentina ranks in the fifth position within wine producers in the world. The grape growing area is located in Andina region with latitudinal amplitude from North to South (22°–40° latitude). Previous studies showed the presence of potentially OTA producer species in wine grapes from Argentina (Rosa et al., 2002; Magnoli et al., 2003; Chulze et al., 2006; Ponsone et al., 2007), but these studies were done in only one region. The grape growing regions in Argentina have distinctive climatic conditions, which determine the cultivated grape varieties and influence wine properties. These agro-ecological differences could influence OTA contamination of grapes and wines.

The objectives of this study were: i) to evaluate the occurrence of *Aspergillus* section *Nigri* in grapes harvested in different grape growing regions of Argentina, ii) to determine the toxigenic ability of the strains isolated, iii) to evaluate OTA contamination in grapes and iv) to correlate the meteorological conditions with the prevalence of *Aspergillus* section *Nigri* species and OTA occurrence.

* Corresponding author. Tel.: +54 358 4676429; fax: +54 358 4676231.
E-mail address: schulze@exa.unrc.edu.ar (S.N. Chulze).
[1] Member of the Research Career of CONICET.

0168-1605/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.013

2. Materials and methods

2.1. Grape sampling

Vineyards from eight grape growing regions located in Argentina were sampled at harvest time 2006/07. The areas sampled included: La Rioja, San Juan — Tulum Valley, San Juan — Pedernal Valley, Mendoza — Uco Valley, Mendoza East, Mendoza ZARM (high area near the Mendoza river), Mendoza South and Neuquén — Río Negro. A total of 50 vineyards were evaluated, distributed as indicated in Fig. 1. Ten plants were sampled along two diagonal transects of vineyard and 3 bunches of grapes were taken from each plant. Therefore, from each vineyard 30 bunches was considered as a sample. Samples were carefully placed in paper bags and stored at 4 °C until laboratory analysis. Data on cropping systems and meteorological conditions (temperature, relative humidity and rain) were obtained from climatic stations close to the vineyards.

2.2. Fungal isolation and identification

To determine the incidence of *Aspergillus* section *Nigri*, from each bunch ten berries were randomly selected (300 berries/sample), surface-disinfected in sodium hypochlorite solution (1%), rinsed in sterile distilled water (3 times) and 100 berries were plated onto dichloran-glycerol 18% (DG18) and dichloran-rose bengal-chloramphenicol (DRBC) media, 50 berries in each media respectively (Pitt and Hocking, 1997). The isolated strains were sub-cultured on malt extract agar (MEA) at 28 °C and the identification at species level was done following the methodology described by Klich (2002). The strains within *Aspergillus* section *Nigri* were classified according to the morphology of their spores and conidial heads into three groups: those with uniseriate conidial heads as *Aspergillus* uniseriates and, among those with biseriate conidial heads, as *A. niger* aggregate and *A. carbonarius* (Bellí et al., 2005a).

The Shannon–Weiner biodiversity index was calculated at harvest time. This index takes into account genus richness and proportion of each genus within a zone. It is given by the formula: $H = -\sum(Pi \log [Pi])$, where *Pi* means proportion of one genus within total population.

2.3. OTA production by Aspergillus isolates

Ochratoxin A production was evaluated according to Bragulat et al. (2001). Three agar plugs (3 mm) of the fungal colony grown in CYA medium were placed in a vial with 1 ml of methanol. After 60 min, the extract was filtered through a membrane filter (syringe filters, 17 mm, 0.45 µm, nylon membranes, TITAN) and injected into a high performance liquid chromatography (HPLC) system as it was described below. The detection limit was 0.05 ng/g of CYA medium.

2.4. Ochratoxin A occurrence

From the 30 bunches sampled in each vineyard, berries were randomly collected, homogenized, mechanically crushed and the OTA content was determined following the methodology proposed by Visconti et al. (2001) with some modifications. Fifty grams of the crushed grapes were mixed with 150 ml polyethylene glycol and sodium hydrogen carbonate solution (5% $NaHCO_3$, 1% PEG 8000). The

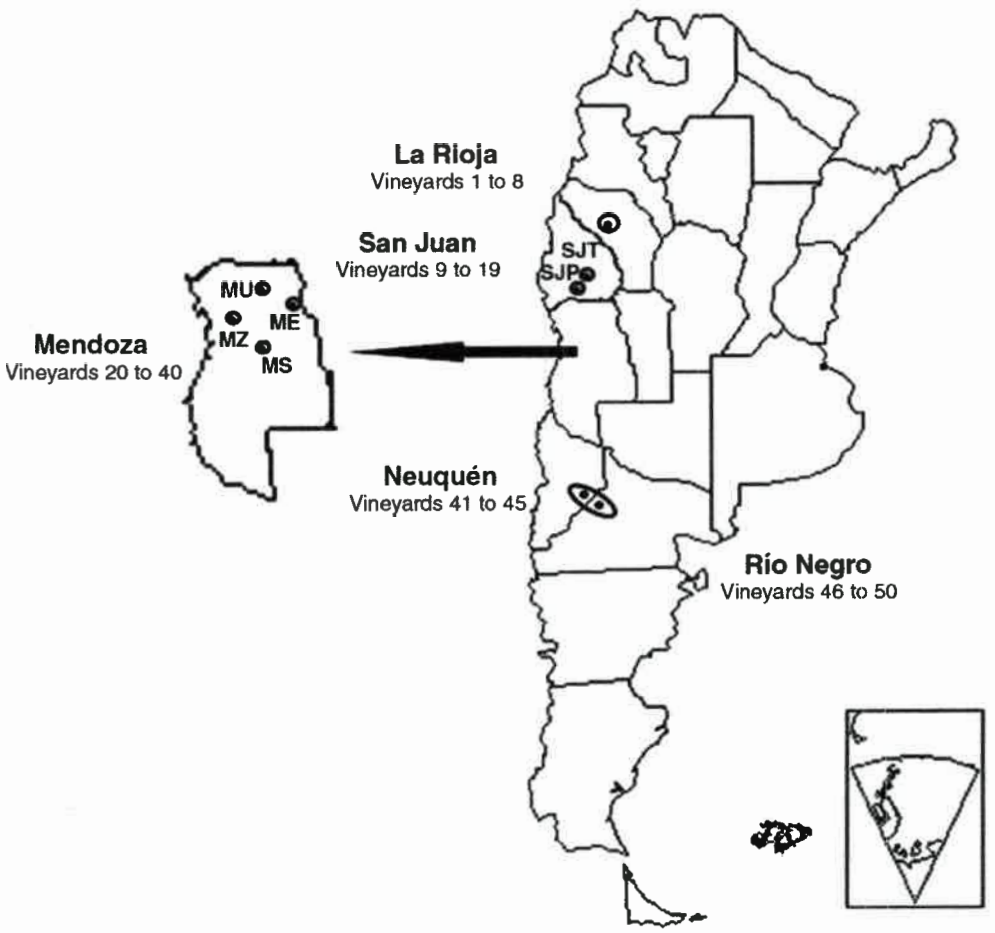


Fig. 1. Location of the sampling areas in Argentina. SJT: San Juan — Tulum Valley, SJP: San Juan — Pedernal Valley, MU: Mendoza — Uco Valley, ME: Mendoza East, MZ: Mendoza ZARM, MS: Mendoza South.

mixture was homogenized in an oscillating shaker for 30 min and filtered through a filter paper (Whatman N°4). The extract was centrifuged at 6400 rpm for 20 min, at 4 °C and immediately filtered through a microfibre filter (Whatman, 0.45 µm). The pH of each sample was adjusted to 7.4 with HCl (0.1 M). A 10 ml portion was taken and added to an immunoaffinity column (OchraTestTM; Vicam, Digen Ltd, Oxford, UK). The column was washed with 5 ml of sodium chloride and polyethylene glycol solution (2.5% NaCl, 0.5% $NaHCO_3$), followed by 5 ml of distilled water. Ochratoxin A was eluted from the column with 1.5 ml methanol and the eluate blown to dryness under nitrogen. The residue was immediately redissolved in the mobile phase and submitted to HPLC analysis. The limit of detection was 0.01 ng/g of grape.

2.5. OTA detection and quantification

The HPLC apparatus used for determination of OTA was a Hewlett-Packard (Hewlett-Packard company, Palo Alto, CA, USA) chromatograph with a loop of 50 µL, equipped with a fluorescence detector ($\lambda exc = 330$ nm and $\lambda em = 460$) and a C18 column (150 × 4.6 mm, 5 µm particle size; Supelcosil LC-ABZ, Supelco, Bellefonte, PA, USA), connected to a pre-column (20 × 4.6 mm, 5 µm particle size; Supelguard LC-ABZ, Supelco). The mobile phase was pumped at 1.0 ml/min, and consisted of an isocratic system composed: acetonitrile, water, acetic acid (99:99:2). OTA was quantified on the basis of HPLC fluorometric response compared with the OTA standard.

2.6. Assay of spiking and recovery of OTA in grapes

OTA-free homogenized grape samples were spiked with standard solutions of OTA to estimate the recovery rate. Concentrations of 0.2, 0.8, 1.5 and 3 ng/g were evaluated. Spiking was carried out in triplicate and blank samples were included. After leaving it for 16 h to allow the solvent to evaporate, OTA concentration was determined, using the protocol previously described. The recovery percentage was 84%.

2.7. Statistical analysis

Data on fungal contamination and OTA concentration in grapes were analyzed by ANOVA test, followed by Tukey mean separation test ($p < 0.05$). Pearson correlation coefficient was used to evaluate the relationship between the frequency of grapes colonized with *A. carbonarius* and the meteorological condition during last month of grape maturation (maximum, mean and minimum temperatures, rain and relative humidity). Correlation between OTA levels in grapes and meteorological data was also determined. All statistical analyses were done using the Software SigmaStat for windows version 2.03 (SPSS Inc.).

3. Results and discussion

A total of 284 *Aspergillus* section *Nigri* strains were isolated from grape samples from eight wine-grape growing regions from Argentina. The highest number of grapes colonized with species belonging to *Aspergillus* section *Nigri* (32.5%) was observed from samples collected in La Rioja region, located at 67°38′ West Longitude, 29° 14′ South Latitude and at 935 m on the sea level. The species diversity (Shannon–Wiener index = 0.49) in this area was higher than in the other regions. The variance analysis showed significant differences between the infection percentages from La Rioja region and San Juan — Pedernal Valley and Mendoza — Uco Valley regions ($p < 0.05$) (Fig. 2). Previously, studies have demonstrated that the meteorological conditions and geographic area can contribute to the variation in grape fungal incidence and OTA contamination (Sage et al., 2004; Battilani et al., 2006a,b; Bellí et al., 2006; Serra et al., 2006a). *In vitro*

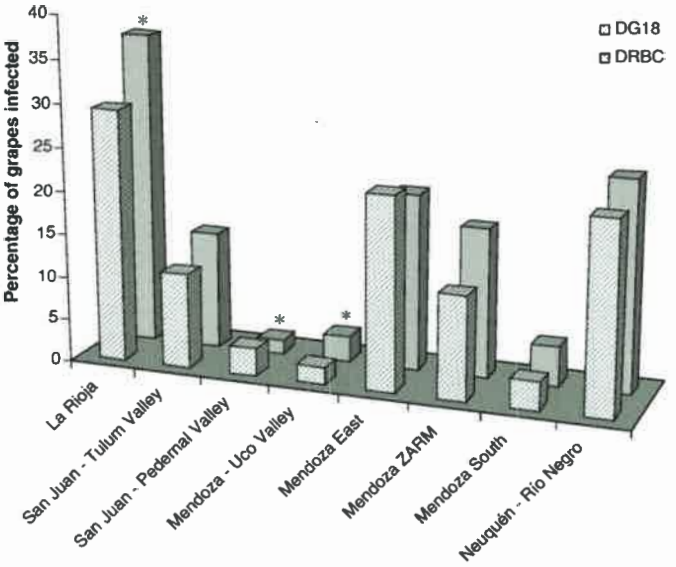


Fig. 2. Proportion of grapes from Argentinean wine-grape growing regions infected with *Aspergillus* section *Nigri*. *Significant difference ($p < 0.001$).

studies showed that the higher the temperatures (30–37 °C), the higher the growth rates of *Aspergillus* section *Nigri* species (Battilani et al., 2003a; Mitchell et al., 2003, 2004; Bellí et al., 2004; Leong et al., 2006b).

Aspergillus species belonging to *A. niger* aggregate were isolated in all regions studied and they were the most common species (81% of isolates), followed by *A. carbonarius* (11% of isolates). The incidence of the latter species in La Rioja region was significantly greater than in San Juan — Pedernal Valley, Mendoza — Uco Valley, Mendoza South and Neuquén — Río Negro regions ($p < 0.05$). *Aspergillus* uniseriates strains comprised only 8% of the isolates and were found in five regions (Fig. 3). The percentage of grapes colonized by *A. carbonarius* was significantly correlated (Pearson) with both mean ($r = 0.67$) and maximum ($r = 0.63$) temperatures at harvest time ($p < 0.0003$ and $p < 0.0009$, respectively). No correlation between rain and *A. carbonarius* occurrence and *A. niger* aggregate species was observed, resulting in a negative correlation with uniseriate species ($r = -0.55$) ($p < 0.005$). The high frequency of *A. carbonarius* in La Rioja

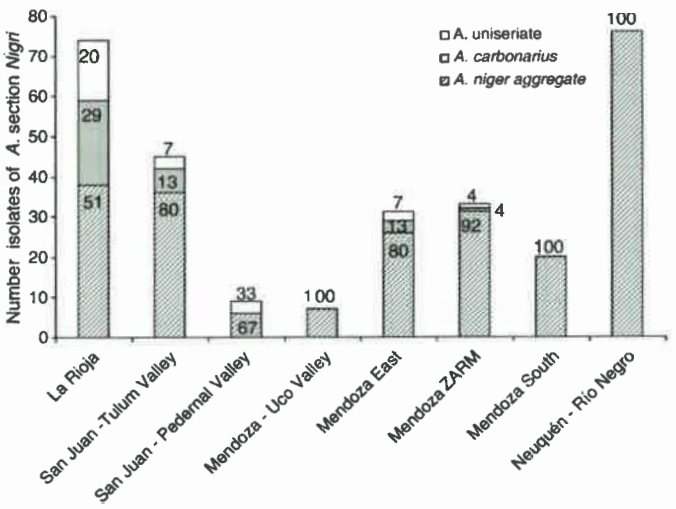


Fig. 3. Number of *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions (the values given on the bars refer to the mean isolation frequency (%) of the different species in each region).The percentages were obtained considering the isolation frequency in both media DRBC and DG18.

region could be attributed to the semi-arid climate with low humidity and summers extremely hot (30–40 °C). Similar results were observed by Battilani et al. (2006b) who showed that *A. niger* aggregate was the major group in all countries and sampling years and *A. carbonarius* was more frequently isolated in hot areas, showing a positive correlation with temperature and negative correlation with rain.

The potential to produce ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* strains is showed in Fig. 4. Thirty-two percent of the strains (91 of 284) were OTA producers, with levels that ranged from 0.5 to 1285 ng/g of CYA. Of these 91 strains, 63 strains (69%) were identified as *A. niger* aggregate and 28 strains (31%) as *A. carbonarius*. Uniseriate species isolated from all regions were not OTA producers. The majority of *A. carbonarius* strains (28 of 31, 90%) produced OTA, and this at high levels ranging from 1.2 to 1285 ng/g (mean 202 ng/g). Whereas, only 63 of 230 *A. niger* aggregate strains (27%) produced OTA, and at lower levels than other species, ranging from 0.5 to 17.50 ng/g (mean 2.24 ng/g). Differences in the toxigenic ability of the strains isolated from different regions were observed. Studies carried out in Europe and Australia showed that *A. carbonarius* is responsible for OTA presence in grapes, due to the percentage of positive strains and the amount of OTA produced *in vitro* (Cabañes et al., 2002; Abarca et al., 2003; Battilani et al., 2003b; Serra et al., 2003; Bejaoui et al., 2006; Leong et al., 2006a; Cozzi et al., 2007). In contrast, different results were previously observed in South America since *A. niger* aggregate strains were found as the main OTA producers in grapes from Argentina and Brazil (Rosa et al., 2002; Magnoli et al., 2003; Ponsone et al., 2007).

Forty-one percent of the grape samples showed low OTA levels, ranging between 0.1 and 1.2 ng/g (Table 1). No correlation between the OTA-producer strains incidence in grapes and OTA grape contamination was established. The presence of *Aspergillus* section *Nigri* does not necessarily determine OTA accumulation in grapes. In contrast, Sage et al. (2002) found a strong correlation between OTA in must samples and the incidence of *A. carbonarius* in grapes. We found a positive correlation between OTA levels and rain during harvest time ($r=0.47$) ($p<0.0001$). However, no correlation with the other variables analyzed (altitude, temperature, latitude, and grapes varieties) was observed. Similar results were obtained by Visconti et al. (2008) in Italy, where the highest OTA levels were found in wine grape growing in Southern regions, where the climate is wetter because of its proximity to the sea, compared with Northern regions. In addition, it was reported that the severity of aspergilli rot is influenced by excessive irrigation prior to ripening, which causes grape splitting. Rain prior to harvest is a common cause of grape damage, favouring *Aspergillus* section *Nigri* entry and subsequent ochratoxin production (Leong et al., 2004; Cozzi et al., 2007).

Table 1
Ochratoxin A incidence in grapes.

Regions	OTA in grapes		
	Samples positive/total[a]	Range ng/g[b]	Median ng/g[c]
La Rioja	5/8	0.10–0.40	0.20
San Juan — Tulum Valley	4/6	0.20–1.20	0.48
San Juan — Pedernal Valley	3/5	0.10–0.25	0.18
Mendoza — Uco Valley	0/5	ND	–
Mendoza East	3/5	0.34–0.35	0.34
Mendoza ZARM	2/5	0.12–0.27	0.20
Mendoza South	2/6	0.23–0.28	0.25
Neuquén — Río Negro	3/10	0.10–0.27	0.17

ND: not detected. Detection limit: 0.01 ng/g.
[a] Contamination samples with OTA of total.
[b] OTA level ranges obtained.
[c] Median levels of OTA in grapes.

Malbec, Syrah and Cabernet Sauvignon grape varieties showed the highest percentages of *A. carbonarius*. Of the 32 *A. carbonarius* strains, 50% was isolated from the Cabernet Sauvignon variety (Fig. 5). These results agree with those of Battilani et al. (2004) who under *in vitro* studies showed that the grape variety affects the incidence of *Aspergillus* section *Nigri* and OTA levels, with Cabernet Sauvignon variety as the most susceptible.

The growth rate of *A. carbonarius* strains from Argentinean dried vine fruits has been determined at different temperatures and water activities (Romero et al., 2007). The maximum growth rate in the assayed conditions was observed at 0.95 a_W and 30 °C. This growing pattern of Argentinean *A. carbonarius* strains was similar to strains reported from Europe, Israel (Mitchell et al., 2004; Bellí et al., 2005b) and Australia (Leong et al., 2006b). These studies also observed a maximum toxin production at 15–20 °C and 0.95–0.98 a_W. Therefore, these data suggested the potential risk of OTA contamination in La Rioja and San Juan regions since the high temperatures during the day and the low temperatures at night could favor the growth of *A. carbonarius* strains and OTA production, respectively.

The grape producing regions from Argentina showed different potential risk of ochratoxin A contamination, due to the distribution of *Aspergillus* section *Nigri* and the meteorological condition of the areas.

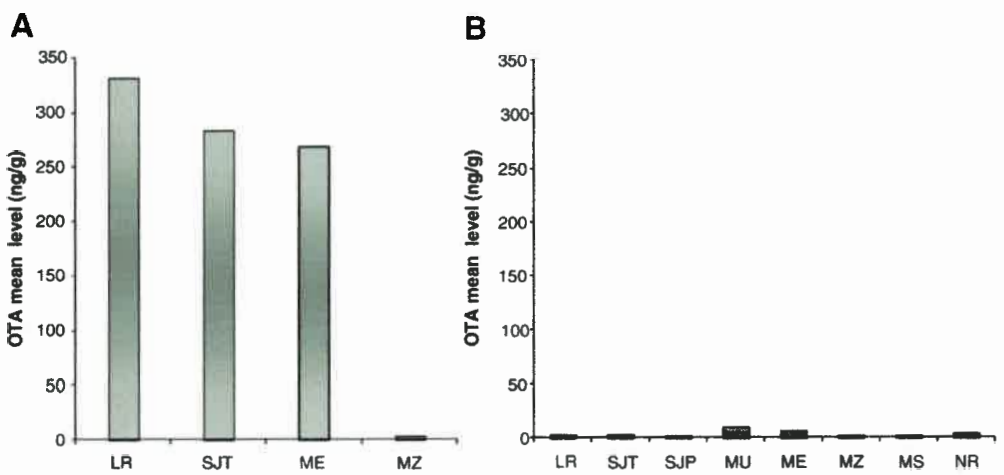


Fig. 4. Mean ochratoxin A levels produced by A) *A. carbonarius* and B) *A. niger* aggregate strains on CYA at 25 °C after 5 days. LR: La Rioja, SJT: San Juan — Tulum Valley, SJP: San Juan — Pedernal Valley, MU: Mendoza — Uco Valley, ME: Mendoza East, MZ: Mendoza ZARM, MS. Mendoza South, NR: Neuquén — Río Negro.

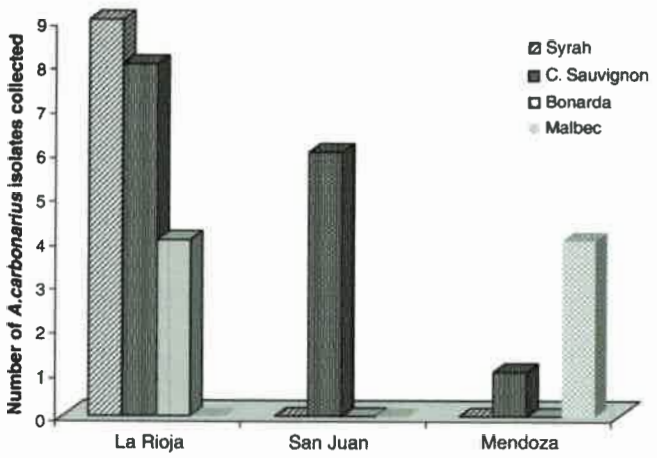


Fig. 5. Incidence of *A. carbonarius* strains in different regions and grape varieties.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from ANPCyT (FONCYT), PICT 25522, and CECyT (Secretaría de Ciencia y Técnica), Universidad Nacional de Río Cuarto.

M. Laura Chiotta and M. Lorena Ponsone are fellows from FONCYT and CONICET, respectively.

References

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellà, G., Cabañes, F.J., 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. Journal of Food Protection 66, 504–506.

Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Bertuzzi, T., Barbano, C., 2003a. Growth and ochratoxin A production of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Italian grapes. Aspects of Applied Biology 68, 175–180.

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z., 2003b. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. Journal of Food Protection 66, 633–636.

Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., Pietri, A., 2004. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 1736–1740.

Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., Pietri, A., 2006a. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. International Journal of Food Microbiology 111, 53–60.

Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z., Magan, N., 2006b. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. International Journal of Food Microbiology 111, 72–82.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. International Journal of Food Microbiology 111, 46–52.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. International Journal of Food Microbiology 96, 19–27.

Bellí, N., Mitchell, D., Marín, S., Alegre, I., Ramos, A.J., Magan, N., Sanchis, V., 2005a. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. European Journal of Plant Pathology 113, 233–239.

Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marín, S., 2005b. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. Journal of Applied Microbiology 98, 839–844.

Bellí, N., Bau, M., Marin, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J., Bragulat, M.R., 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. International Journal of Food Microbiology 111, 40–45.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. International Journal of Food Microbiology 71, 139–144.

Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? International Journal of Food Microbiology 79, 213–215.

Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grape and dried vine fruits in South America. International Journal of Food Microbiology 111, 5–9.

Cozzi, G., Perrone, G., Epifani, F., Pascale, M., Visconti, A., 2007. Epidemiology of ochratoxin A producing fungi in Apulian vineyards. Poster 1422r presented at XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 2007 May 21–25, Istanbul.

European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union 364, 5–24.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. In: Ochratoxin, A. (Ed.), Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56. IARC, Lyon, France, pp. 489–521.

Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau Voorschimmelculturs, Utrecht, The Netherlands.

Leong, S., Hocking, A.D., Pitt, J.I., 2004. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. Australian Journal of Grape and Wine Research 10, 83–88.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2006a. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. International Journal of Food Microbiology 111, 10–17.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scot, E.S., 2006b. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. International Journal of Food Microbiology 110, 209–216.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A., 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. Letters in Applied Microbiology 37, 179–184.

Majerus, P., Otteneder, H., 1996. Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubsaft. Dtsch Lebensm-Rundsch 92, 388–390.

Mitchell, D., Aldred, D., Magan, N., 2003. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. Aspects of Applied Biology 68, 109–116.

Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N., 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. Journal of Applied Microbiology 97, 439–445.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and Food Spoilage, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. International Journal of Food Microbiology 114, 131–135.

Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Vaamonde, G., 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. International Journal of Food Microbiology 115, 140–143.

Rosa, C.A.R., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food Additives and Contaminants 19, 408–414.

Sage, L., Krivoboc, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. Journal of Agriculture and Food Chemistry 50, 1306–1311.

Sage, L., Garon, D., Seigle-Murandi, F., 2004. Fungal microflora and ochratoxin risk in French vineyards. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52, 5764–5768.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venancio, A., 2003. Black aspergilli as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. International Journal of Food Microbiology 88, 63–68.

Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A., 2006a. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. The British Mycological Society 110, 71–78.

Serra, R., Mendonça, C., Venâncio, A., 2006b. Ochratoxin A ocurrence and production in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. International Journal of Food Microbiology 111, 35–39.

Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G., 2001. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and HPLC. Journal of Chromatography A 864, 89–101.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. Food Additives and Contaminants 25, 193–202.

Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants 13, 655–668.

Letters in Applied Microbiology

Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254

ORIGINAL ARTICLE

Influence of *Planococcus ficus* on *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A incidence in vineyards from Argentina

M.L. Chiotta[1], M.L. Ponsone[1], A.M. Torres[1], M. Combina[2] and S.N. Chulze[1]

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

2 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina

Keywords
Argentinean vineyards, *Aspergillus* section *Nigri*, grapes, ochratoxin A, *Planococcus ficus*.

Correspondence
Sofía N. Chulze, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional no. 36 Km 601 (5800), Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
E-mail: schulze@exa.unrc.edu.ar

2010\0271: received 12 February 2010, revised 28 May 2010 and accepted 30 May 2010

doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02884.x

Abstract

Aim: The aim of this work was to evaluate the effect of *Planococcus ficus* infection in red wine grapes on *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A (OTA) contamination.

Methods and Results: During 2006/2007 and 2008/2009 vintages, Merlot, Malbec and Cabernet Sauvignon varieties divided into two categories of grape samples (undamaged and damaged by *P. ficus*) were evaluated. Regardless of the grape variety and the harvest season evaluated, *Aspergillus* section *Nigri* incidence and the mean OTA concentration in damaged berries were significantly higher than that in the undamaged ones ($P < 0{\cdot}05$; $P < 0{\cdot}001$). The Merlot variety showed the highest level of black aspergilli contamination in damaged grapes during the 2006/2007 vintage (53·5% of infection), whereas Malbec presented the highest incidence during the 2008/2009 vintage (57·6% of infection). The Cabernet Sauvignon variety showed the highest OTA levels, ranging from 0·1 to 140 $\mu g\ kg^{-1}$.

Conclusions: The presence of *P. ficus* in vineyards increased the risk of OTA occurrence in grapes, suggesting the need to implement insect control at preharvest stage to reduce the entry of OTA in the wine production chain.

Significance and Impact of the Study: This study is the first report on the influence of *P. ficus* on the potential risk of OTA contamination in grapes.

Introduction

Aspergillus bunch rot is a preharvest mouldy disease caused by species belonging to *Aspergillus* section *Nigri* (Emmett *et al.* 1992). Some species of black aspergilli are able to produce ochratoxin A (OTA) on several substrates, mainly *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* aggregate, that are known to produce this toxin in grapes and raisins (Varga and Kozakiewicz 2005; Battilani *et al.* 2006a; Leong *et al.* 2006). Berry damage may occur because of birds, insects or infection by fungal species, being these the primary factors affecting the *Aspergillus* bunch rots and the subsequent production of OTA in grapes.

Ochratoxin A has been demonstrated to be nephrotoxic and has been associated with a fatal human kidney disease, referred to as Balkan Endemic Nephropathy (BEN) and with an increase in tumour incidence of the upper urinary tract (Marquardt and Frohlich 1992). It has also showed carcinogenic, immunotoxic, genotoxic, teratogenic and possibly neurotoxic properties. The presence of OTA has been reported in a wide range of foods and beverages, in body fluids and in kidneys of animals and humans (EFSA 2006). Natural occurrence of OTA has been observed in grapes and derived products such as dried vine fruit, grape juices and wine (Zimmerli and Dick 1996; Serra *et al.* 2003; Magan and Olsen 2004). Specific regulations for OTA have established 2 $\mu g\ kg^{-1}$ as the maximum level of OTA allowed for wines, musts and grapes in the European Union (European Commission 2006).

High infestation levels by *Planococcus ficus* Signoret (Order *Hemiptera*, Family *Pseudococcidae*) have been

© 2010 The Authors

found in most grape-production areas throughout the world. It is of particular economic importance on grapevines in the Mediterranean region, South Africa, Pakistan and Argentina (Ben-Dov 1994; Ben-Dov and Matile-Ferrero 1995). Recently, high infestation levels have been reported in the vineyards of Mendoza province, one of the most important wine production regions from Argentina. This zone accounts for 70% of the vineyards and 158 833 ha of the total area, which is cultivated with varieties suitable for making high-quality wines (Fanzone *et al.* 2010). Grapes are susceptible to insect attack and fungal diseases that can reduce the quality of the harvested grapes and affect the organoleptic features of wines. During the life cycle of *P. ficus*, six generations are completed in 1 year. In winter, the insect remains primarily as cottony egg masses grouped under the bark of the plants. As soon as temperature rises, it moves out onto aerial portions of the plants, setting on buds and leaves. As from the third generation (veraison season), the insect remains all over the plant through the rest of the season. In the fall, the downward migration of the vine mealybug takes place once again (Becerra *et al.* 2006). On bunches, *P. ficus* dehydrates grapes by perforating the grape skin, produces sugary substances that allow spoilage fungi development and, consequently, decreases the wine quality. Previous studies showed the presence of potential OTA producer species in wine grapes from Argentina (Magnoli *et al.* 2003; Chulze *et al.* 2006; Ponsone *et al.* 2007; Chiotta *et al.* 2009). The presence of the insect in grapevines could be responsible for the increase in *Aspergillus* section *Nigri* species and OTA occurrence in damaged berries. Therefore, the aim of this study was to evaluate the interaction between berries damaged by *P. ficus*, level of infection with *Aspergillus* section *Nigri* and OTA occurrence in wine grapes.

Materials and methods

Grape sampling

Vineyards from a grape-growing region located in Mendoza, Argentina, were sampled during 2006/2007 and 2008/2009 vintages. All the vineyards were settled at 31° 1′ South Latitude 68° 52′ West Longitude. The sampling was conducted during the ripening stage (late February–March) in vineyards that had a history of *P. ficus* infestation. Malbec, Merlot and Cabernet Sauvignon grape varieties were analysed. Areas of infection by *P. ficus* were observed in all the vineyards. Bunches of grapes were collected from each plant with visual infection symptoms and categorized as damaged berries. The samples collected from neighbouring healthy plants were categorized as undamaged ones. Three bunches of plants were considered as a sample, and twenty samples were taken from each vineyard, ten of each category: damaged and undamaged berries.

Fungal isolation and identification

To determine the incidence of fungal genera from each bunch, ten berries were randomly selected (300 berries per sample), surface-disinfected for 1 min in sodium hypochlorite solution (1%), rinsed in sterile distilled water (three times), and 100 berries placed on the surface of Dichloran-Rose Bengal-Chloramphenicol (DRBC) medium. The plates were incubated at 25°C for 7 days. After the incubation period, all fungal colonies were identified according to Samson *et al.* (2000), and the percentage of grapes infected by each genus was determined. *Aspergillus* section *Nigri* colonies were picked and subcultured on malt extract agar at 28°C. Identification at species level was performed according to the methodology described by Klich (2002). The species were classified into three main proposed groups: *A. niger* aggregate, *A. carbonarius* and *Aspergillus uniseriate*.

Ochratoxin A occurrence

From each vineyard, 20 samples (10 from damaged grapes and 10 from undamaged grapes) were collected by variety. For toxin analysis, three bunches/plant were considered a sample. Berries were randomly selected, homogenized, mechanically crushed, and OTA content was determined following the methodology proposed by Visconti *et al.* (2001) with some modifications. Fifty grams of grapes was mixed with 150 ml of polyethylene glycol and sodium hydrogen carbonate solution (5% $NaHCO_3$, 1% PEG 8000). The mixture was homogenized in an oscillating shaker for 30 min and filtered through a filter paper (Whatman N°4). The extract was centrifuged at 2290 ***g*** for 20 min, at 4°C and immediately filtered through a microfibre filter (Whatman, 0·45 μm). The pH of each sample was adjusted to 7·4 with HCl (0·1 mol l^{-1}). A ten-millilitre portion was taken and added to an inmunoaffinity column (OchraTestTM; Vicam, Digen Ltd, Oxford, UK). The column was washed with 5 ml of sodium chloride and polyethylene glycol solution (2·5% NaCl, 0·5% $NaHCO_3$), followed by 5 ml of distilled water. Ochratoxin A was eluted from the column with 1·5 ml methanol and the eluate blown to dryness under nitrogen. The residue was immediately resuspended in mobile phase and submitted to HPLC analysis.

The HPLC system was a Hewlett–Packard (Hewlett–Packard company, Palo Alto, CA, USA) chromatograph with a loop of 50 μl, equipped with a fluorescence detector

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 The Society for Applied Microbiology,

(λexc = 330 nm and λem = 460) and a C18 column (150 × 4·6 mm, 5 μm particle size; Luna-Phenomenex, Torrance, CA), connected to a precolumn (20 × 4·6 mm i.d., 5-μm particle size; Security Guard, Phenomenex). The mobile phase was pumped at 1·0 ml min^{-1} and consisted of an isocratic system composed by acetonitrile/water/acetic acid (99 : 99 : 2, by vol.). OTA was quantified based on HPLC fluorometric response compared with the OTA standard. The limit of detection was 0·01 $\mu g\ kg^{-1}$.

Statistical analysis

To determine whether there were significant differences between undamaged and damaged grapes by *P. ficus* in relation to *Aspergillus* section *Nigri* species infection and OTA occurrence, data were analysed by ANOVA test, followed by Tukey mean separation test ($P < 0·001$; $P < 0·05$).

Results

Mycoflora in wine grape samples

Over the two vintages of study, different levels of fungal contamination were observed that were related to the vintage year, grape variety and category (damaged and undamaged grape). During the 2006/2007 vintage, *Alternaria* species showed the highest incidence in all varieties independent of grape damage. *Alternaria* species infection ranged from 45·8 to 91·6% (mean 69·8%) in damaged grapes and ranged from 21·4 to 79·6% (mean 53·7%) in undamaged grapes. *Aspergillus*, *Penicillium* species and yeasts were the other most frequent mycoflora isolated, and their infection levels were higher in damaged grapes than that in undamaged ones. On the other hand, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Trichoderma* species were isolated at low percentages, <10%. During the 2008/2009 vintage, the grape samples showed high percentages of yeast contamination, reaching 99% in the Cabernet Sauvignon variety. The grape infection with *Alternaria* and *Aspergillus* species was relevant only in damaged grapes from the Malbec variety, with a percentage of 57 and 57·6%, respectively. Statistical significant differences in the fungal infection levels between undamaged and damaged berries were observed, and the higher levels were detected in damaged berries ($P < 0·05$; $P < 0·001$) (Figs 1 and 2).

Aspergillus section *Nigri* incidence

Ninety-nine per cent of *Aspergillus* species isolated from all grape samples analysed were identified as *Aspergillus* section *Nigri*. The frequency of grape samples contaminated ranged from 70 to 100% during the 2006/2007 vintage, whereas during the 2008/2009 vintage only from

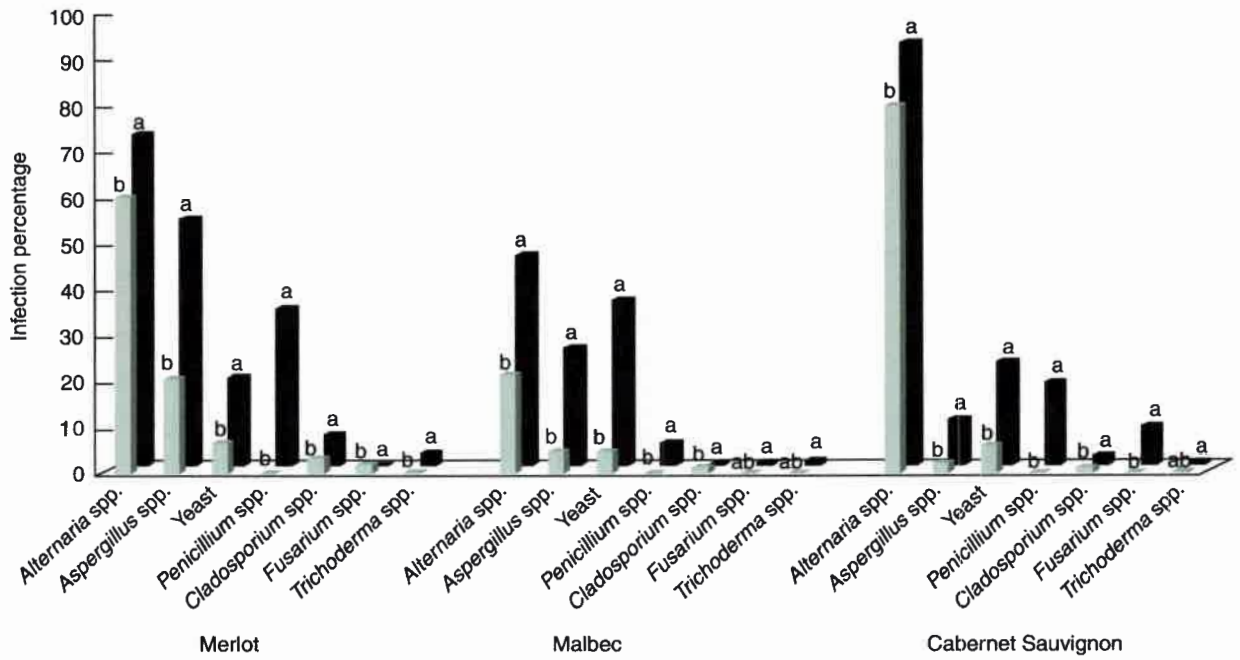


Figure 1 Mycoflora isolated from undamaged and damaged grapes by *Planococcus ficus* during 2006/2007 vintage. Different letters over bars indicate significant differences in the infection percentage of the mycoflora between damaged and undamaged grapes ($P < 0.05$; $P < 0.001$). (■) Damaged and (■) Undamaged.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 The Society for Applied Microbiology,

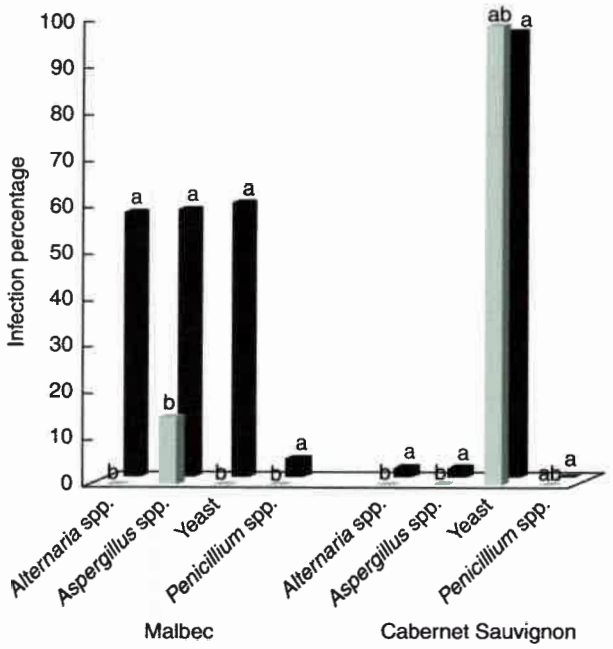


Figure 2 Mycoflora isolated from undamaged and damaged grapes by *Planococcus ficus* during 2008/2009 vintage. Different letters over bars indicate significant differences in the infection percentage of the mycoflora between damaged and undamaged grapes ($P < 0.05$; $P < 0.001$). (■) Damaged and (■) Undamaged.

0 to 50% of the samples were infected (Table 1). Regardless of the grape variety and the vintage evaluated, damaged berries showed the highest levels of contamination with *Aspergillus* section *Nigri* ($P < 0{\cdot}05$). The stains isolated were identified as species belonging to *A. niger* aggregate (98%). *Aspergillus uniseriate* species were occasionally isolated (2%), and no *A. carbonarius* was found in any of the vintages or varieties sampled.

The Merlot variety showed the highest levels of *Aspergillus* section *Nigri* contamination, 53·5% and 20% in damaged and undamaged berries, respectively during the 2006/2007 vintage. In contrast, the Malbec variety showed the highest incidence, 57·6 and 14% in damaged and undamaged berries, respectively, during 2008/2009 vintage (Fig. 3).

Ochratoxin A occurrence in wine grapes

Of 100 samples evaluated, 27% showed ochratoxin A contamination in levels ranging from 0·1 to 140·2 $\mu g\ kg^{-1}$ (Table 1). The mean ochratoxin A concentration was significantly higher in damaged berry samples than that in undamaged ones ($P < 0{\cdot}001$). Merlot and Cabernet Sauvignon varieties showed OTA levels ranging from 0·1 to 140·2 $\mu g\ kg^{-1}$, in the 2006/2007 vintage. However, lower OTA levels were detected in the 2008/2009 vintage, ranging from 0·1 to 11·8 $\mu g\ kg^{-1}$. The Cabernet Sauvignon variety showed the highest levels of toxin detected in damaged grapes during both vintages evaluated (mean levels: 51·2 and 8·6 $\mu g\ kg^{-1}$ in 2006/2007 and 2008/2009, respectively).

Discussion

This study provides new data on the infection of *P. ficus* on wine grapes, and the subsequent effect on *Aspergillus* section *Nigri* inoculum distribution and OTA occurrence.

Table 1 *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A levels in undamaged and damaged grapes by *Planococcus ficus*

			Aspergillus section *Nigri* incidence*		Ochratoxin A ocurrence		
Vintage	Grape varieties	Grape categories	Range (%)†	Frequency (%)‡	Samples positive/total	Range ($\mu g\ kg^{-1}$)	Mean ($\mu g\ kg^{-1}$)
2006/2007	Merlot	Undamaged	6–70	100	5/10	0·5–15·6	7·2a
		Damaged	2–78	100	7/10	1·3–50·2	15·3b
	Malbec	Undamaged	2–14	80	0/10	ND	–
		Damaged	2–88	90	0/10	ND	–
	Cabernet sauvignon	Undamaged	4–70	90	1/10	0·1	0·1a
		Damaged	2–80	70	9/10	2·7–140·2	51·2b
2008/2009	Malbec	Undamaged	0–25	50	0/10	ND	–
		Damaged	4–70	20	3/10	0·1–1·0	0·6
	Cabernet sauvignon	Undamaged	ND	0	1/10	5·4	5·4a
		Damaged	0–20	10	7/10	0·1–11·8	8·6b

Detection limit: 0·01 $\mu g\ kg^{-1}$. Significant differences: $P < 0{\cdot}001$.
ND, not detected.
*The main species isolated from damaged and undamaged grapes belonged to *Aspergillus niger* aggregate.
†*Aspergillus* section *Nigri* infection ranges obtained among the ten samples analysed by category.
‡Isolation frequency: number of infected samples of total samples analysed by vineyard.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 The Society for Applied Microbiology,

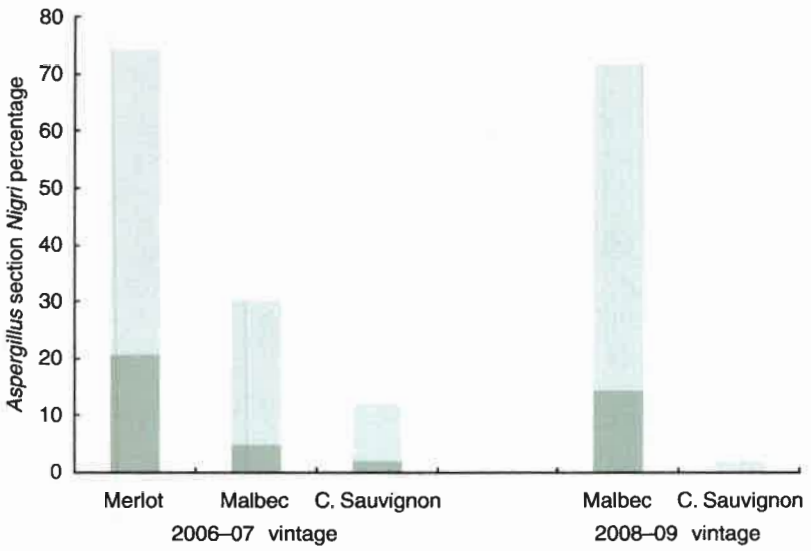


Figure 3 Percentage of berries colonized by *Aspergillus* section *Nigri* strains in damaged and undamaged grapes. ( ) Damaged grapes and (■) Undamaged grapes.

Alternaria species were detected in high percentage in the three grape varieties evaluated during the 2006/2007 vintage and were relevant only in the Malbec variety during the 2008/2009 vintage. The presence of *Alternaria* species in grape needs to be considered because these species also have been described as potential mycotoxins alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether producers in red wines (Scott *et al.* 2006). *Aspergillus* was the other relevant fungal genus isolated in both vintages, the infection frequency varied with the grape variety and insect damage. *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Trichoderma* species were occasionally isolated from the grapes. These results agree with a previous study on the wine grapes mycoflora from Argentina, where the authors found that *Alternaria* and *Aspergillus* were the most frequent genera in the same wine grape-growing region (Magnoli *et al.* 2003).

During the 2008/2009 vintage, a high percentage of yeasts were isolated from the damaged and undamaged grape samples in the two grape varieties evaluated. These findings could explain the lower incidence of filamentous species during this vintage. It is important to highlight the presence of yeasts, as studies on mechanisms of antagonism for space and nutrients have demonstrated that yeasts can be used as potential biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus* on grapes. Bleve *et al.* (2006) showed that *Cryptococcus laurentii* and *Aureobasidium pullulans* were the most promising species. Preliminary results obtained in our laboratory have also shown the ability of *Kluyveromyces thermotolerants* strains to inhibit *Aspergillus* section *Nigri* growth and OTA accumulation (Ponsone *et al.* 2008).

Grapes infested by *P. ficus* showed the highest *Aspergillus* section *Nigri* incidence, mainly species belonging to *A. niger* aggregate. This insect could contribute to grape damage while it is actively feeding, affecting the integrity of the berries and favouring the colonization of ochratoxigenic species. Besides, *P. ficus* secretes sugary substances covering leaves and fruits, being important for the survival of several species of ants. The sugary substances could also be a good substrate for fungal growth. In our study, ants were collected from infected plants and plated onto the surface of the DRBC medium. Black aspergilli growth was observed after 7 days of incubation and showed that ants can also disseminate black *Aspergillus* on grapes (data not shown).

Ochratoxin A accumulation was dependent of the grape category, grape variety and the vintage year. The highest OTA contamination levels were detected in grapes damaged by *P. ficus* being relevant during 2006/2007 vintage. Different OTA levels observed between vintages could be attributed to the variations in climatic conditions since during the 2006/2007 vintage higher humidity levels in comparison with the 2008/2009 vintage were observed (51 and 39% of relative humidity, respectively) (INTA 2010). These data agree with previous findings, where we showed a positive correlation between OTA levels and rain during harvest time (Chiotta *et al.* 2009). Similar results were obtained by Visconti *et al.* (2008) in Italy, who found the highest OTA levels in more humid regions. In addition, other studies have demonstrated that meteorological conditions contributed to the variation in *Aspergillus* section *Nigri* incidence and OTA occurrence on grapes (Sage *et al.* 2004; Battilani *et al.* 2006a,b; Bellí *et al.* 2006; Serra *et al.* 2006). With regard to the variety, although Cabernet Sauvignon showed low *Aspergillus* section *Nigri* incidence, high OTA levels were found in damaged berries during both vintages. These

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 The Society for Applied Microbiology,

findings can be explained by the different susceptibility of some varieties to berry splitting, and the consequent greater risk for black aspergilli infection and subsequent OTA contamination. Studies carried out in Europe also showed that the grape variety affected the incidence of *Aspergillus* section *Nigri* and OTA levels, being the Cabernet Sauvignon variety the most susceptible (Battilani *et al.* 2004).

The effect of insect pest damage on ochratoxigenic *Aspergillus* infection and OTA content in grape berries was observed by *Lobesia botrana*. This insect is the principal grape berry moth in the vineyards of Southern Europe, and its larvae can either contribute to spore dispersal or act as spore vectors, by trapping conidia in the cuticle ornamentation, then facilitating a rapid fungal penetration by tunnelling into berries, as demonstrated for *Botrytis cinerea* (Fermaud and Le Menn 1989, 1992; Cozzi *et al.* 2006). The results obtained in this study showed the important role of the insect in grape skin damage in wine grapes in relation to fungal infection. *P. ficus* can be considered as a source of grape skin damage because *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A contamination increased in vineyards infested by this insect. Therefore, the implementation of preventive measures to minimize berry damage in the field, such as controlling pathogenic fungi and insects during grape growing and the remotion of visibly damaged grapes at harvest, could significantly reduce OTA contamination in grapes.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from ANPCyT (FONCYT), PICT 25522 and SECyT (Secretaría de Ciencia y Técnica), Universidad Nacional de Río Cuarto. Mic. M. Laura Chiotta has a fellowship from CONICET.

References

Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T. and Pietri, A. (2004) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *J Sci Food Agric* **84**, 1736–1740.

Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S. and Pietri, A. (2006a) Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *Int J Food Microbiol* **111**, 53–60.

Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z. and Magan, N. (2006b) Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *Int J Food Microbiol* **111**, 72–82.

Becerra, V., González, M., Herrera, M.E. and Miano, J.L. (2006) Dinámica poblacional de *Planococcus ficus* Sing. (Hemiptera-Pseudococcidiae) en viñedos. Mendoza (Argentina). *Rev. FCA UnCuyo* **1**, 1–6.

Bellí, N., Bau, M., Marin, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J. and Bragulat, M.R. (2006) Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *Int J Food Microbiol* **111**, 40–45.

Ben-Dov, Y. (1994) A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with data on geographical distribution. In *Host plant, Biology and Economic Importance*. pp. 686. Andover, UK: Intercept Limited.

Ben-Dov, Y. and Matile-Ferrero, D. (1995) The identity of the mealybug taxa described by V.A. Signoret (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *BSEF* **100**, 241–256.

Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A. and Visconti, A. (2006) Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol from *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol* **108**, 204–209.

Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M. and Chulze, S.N. (2009) *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine grape growing regions in Argentina. *Int J Food Microbiol* **136**, 137–141.

Chulze, S.N., Magnoli, C.E. and Dalcero, A.M. (2006) Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grape and dried vine fruits in South America. *Int J Food Microbiol* **111**, 5–9.

Cozzi, G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A. and Logrieco, A. (2006) Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *Int J Food Microbiol* **111**, 88–92.

EFSA (2006) European Food Safety Authority. opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain of the EFSA on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J.* **365**, 1–56 Available at: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/152. Par 001.File.dat/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en1.pdf (accessed 5 September 2007).

Emmett, R.W., Harris, A.R., Taylor, R.H. and McGechan, J.K. (1992) Grape diseases and vineyard protection. In *Viticulture Practices*, **Vo 2**. ed. Coombe, B.G. and Dry, P.R. pp. 232–278. Adelaide: Winetitles.

European Commission (2006) Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Off J Eur Union* **25**, 3–5.

Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M. and Zamora, F. (2010) Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *J Agric Food Chem* **58**, 2388–2397.

Fermaud, M. and Le Menn, R. (1989) Association of *Botrytis cinerea* with grape berry moth larvae. *Phytopathology* **79**, 65–656.

Fermaud, M. and Le Menn, R. (1992) Transmission of *Botrytis cinerea* to grape by grape berry moth larvae. *Phytopathology* **82**, 1393–1398.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 The Society for Applied Microbiology,

INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2010) Available at: http://www.inta.gov.ar/mandoza/clima/clima.htm (accessed 26 March 2010).

Klich, M.A. (2002) *Identification of Common Aspergillus species*. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voorschimmelculturs.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W. and Scott, E.S. (2006) Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *Int J Food Microbiol* **111**, 10–17.

Magan, N. and Olsen, M. (2004) *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. and Dalcero, A. (2003) Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Lett Appl Microbiol* **37**, 179–184.

Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci* **70**, 3968–3988.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A. and Chulze, S. (2007) Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and nonorganic systems. *Int J Food Microbiol* **114**, 131–135.

Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M. and Chulze, S. (2008) Epiphytic yeasts isolated from red wine grapes with biocontrol potential. In *6th Congreso Latinoamericano de Micología (VI CLAM)*. pp. 166. Mar del Plata, Argentina: Asociación Latinoamericana de Micología (abstract).

Sage, L., Garon, D. and Seigle-Murandi, F. (2004) Fungal mycoflora and ochratoxin risk in French vineyards. *J Agric Food Chem* **52**, 5764–5768.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2000) *Introduction to Food and Airborne Fungi*. The Netherlands: Centraalbureau Voorschimmelculturs-Utrecht Ponson and Looyen, Wageningen Press.

Scott, P.M., Lawrence, G.A. and Lau, B.P.Y. (2006) Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotox Res* **22**, 142–147.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. and Venancio, A. (2003) Black Aspergillus species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int J Food Microbiol* **88**, 63–68.

Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P. and Venâncio, A. (2006) Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Brit Mycol Soc* **110**, 71–78.

Varga, J. and Kozakiewicz, Z. (2005) Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Food Sci Technol* **17**, 72–81.

Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G. (2001) Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and HPLC. *J Chromatogr A* **864**, 89–101.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G. and Solfrizzo, M. (2008) Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit Contam* **25**, 193–202.

Zimmerli, B.A. and Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grapejuice: occurrence and risk assessment. *Food Addit Contam* **13**, 655–668.

© 2010 The Authors

Journal of Applied Microbiology

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Molecular characterization and toxigenic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from the main grape-growing regions in Argentina

M.L. Chiotta[1]*, M.M. Reynoso[1]†, A.M. Torres[1]†, M. Combina[2]† and S.N. Chulze[1]†

1 Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

2 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina

Keywords

AFLP markers, *Aspergillus* section *Nigri*, genetic diversity, grapes, ochratoxin A.

Correspondence

María Laura Chiotta, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional No 36 Km 601 (5800), Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

E-mail: mchiotta@exa.unrc.edu.ar

*Fellow from CONICET.

†Members of the Research Career of CONICET.

2010/1099: received 28 June 2010, revised 18 October 2010 and accepted 2 November 2010

doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04898.x

Abstract

Aims: The objective of this study was to evaluate the biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations from Argentinean vineyards by morphological, toxigenic and AFLP analysis.

Materials and methods: Five hundred and thirty-eight strains were isolated from grapes during 2006/07 and 2007/08 vintages. The morphological identification and toxigenic profile for all strains isolated were performed. Eighty-eight strains were selected for characterization at species level by AFLP markers. Cluster analysis showed a clear separation into four main groups: *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger* 'aggregate' and *Aspergillus* 'uniseriate'. *A. carbonarius* strains constituted a homogeneous group, while a high degree of genetic diversity was found within the *A. niger* 'aggregate' and '*A. uniseriate*' clusters. The *A. tubingensis* cluster was the most prevalent group and was clearly separated from *A. niger* 'aggregate'. Ten strains showed 45% homology with *A. tubingensis* FRR 5720 *ex*-type strain and were considered as 'atypical' or a closely related species. AFLP results indicate that no genotypical differences can be established between ochratoxigenic and nonochratoxigenic strains.

Conclusions: *Aspergillus* section *Nigri* populations on grapes were represented mainly by four groups. *A. tubingensis* species were separated from *A. niger* 'aggregate' group and some of their strains produced OTA.

Significance and Impact of the Study: This study provides new data on molecular characterization of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentina.

Introduction

Aspergillus section *Nigri* species have gained importance in the last decade as they are described as the main source of ochratoxin A (OTA) contamination in grapes and wine worldwide (Zimmerli and Dick 1996; Visconti *et al.* 2008). OTA is a nephrotoxic mycotoxin and also exhibits carcinogenic, teratogenic and immunotoxic properties in rats and possibly in humans (IARC 1993), while its genotoxicity remains controversial (EFSA 2006). Different surveys have analysed the epidemiology, ecology and distribution of black aspergilli occurring in vineyards from different regions (Da Rocha Rosa *et al.* 2002; Serra *et al.* 2003; Bellí *et al.* 2004; Sage *et al.* 2004; Battilani *et al.* 2006a; Leong *et al.* 2006). These studies have shown that the main ochratoxigenic black aspergilli species occurring on grapes are *Aspergillus niger* 'aggregate' and *Aspergillus carbonarius*. These species differ in their OTA-producing ability, because the percentage of *A. carbonarius* OTA-producing strains and the levels produced are higher than those reported for strains belonging to *A. niger* 'aggregate'. However, in the vineyards, *A. niger* 'aggregate' appears to be a dominant species within the section *Nigri*, and its presence can also contribute to

© 2010 The Authors

OTA contamination in a varying degree (Bau *et al.* 2005; Bellí *et al.* 2006; Battilani *et al.* 2006b; Leong 2007).

Argentina ranks fifth among wine producers in the world. The grape-growing area is located in Andina region (latitude 40–22°S). Previous studies carried out in Argentinean vineyards revealed that species included within the *A. niger* 'aggregate' were the dominant species isolated from Mendoza wine-growing region (Magnoli *et al.* 2003; Ponsone *et al.* 2007). *A carbonarius* species was mainly isolated from other regions such as La Rioja and San Juan (Chiotta *et al.* 2009). These species were identified using only morphological criteria. However, the difficulties in their recognition suggest that it is necessary to carry out an adequate molecular characterization because the toxin profiles of individual strains vary and to define potential toxicological risks. Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) can be a useful tool to clarify the identification of black aspergilli occurring on grapes. It is a genotyping method based on the selective amplification of a subset of DNA fragments generated by restriction enzymes digestion (Vos *et al.* 1995). AFLPs allow for differentiation of a large number of polymorphisms with only little variation of the protocol and with a high power of discrimination, reproducibility and robustness. This technique has proved useful for the classification at the species level allowing for the evaluation of the genetic relatedness between them and closely related species (Treadway *et al.* 1999; Marasas *et al.* 2001; Zeller *et al.* 2003). Previous studies suggested the presence of four groups assigned to *Aspergillus* section *Nigri* by AFLPs, and that AFLPs could separate species very closely related morphologically and phylogenetically, such as *A. tubingensis* from *A. niger* 'aggregate' (Perrone *et al.* 2006a,b). Also, these markers have been used to study fungal populations from other mycotoxigenic genera such as *Fusarium* (Chulze *et al.* 2000; Zeller *et al.* 2004; Reynoso *et al.* 2009), *Aspergillus* (Montiel *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2004; Barros *et al.* 2007) and *Penicillium* (Castella *et al.* 2002; Frisvad *et al.* 2005).

The aims of this study were as follows: (i) to evaluate the biodiversity within *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from Argentinean vineyards using AFLP molecular markers; (ii) to determine the genetic diversity and relatedness among the species isolated; and (iii) to associate the genetic diversity with the toxigenic profile of the strains.

Materials and methods

Strain identification

A total of 538 *Aspergillus* section *Nigri* strains were isolated and collected from 50 vineyards belonging to seven grape-growing regions in Argentina, during 2006/07 and 2007/08 vintages. The areas sampled included the following: La Rioja – Chilecito, San Juan – Tulum Valley, Mendoza – Uco Valley, Mendoza North-East, Mendoza ZARM (high area near Mendoza River), Mendoza South and Neuquén-Río Negro. The species identification was carried out using morphological criteria according to Klich (2002). The strains within *Aspergillus* section *Nigri* were classified according to the morphology of their spores and conidial heads into three groups: those with uniseriate conidial heads as *Aspergillus* 'uniseriate' and, among those with biseriate conidial heads, as *Aspergillus niger* 'aggregate' and *Aspergillus carbonarius*.

Ochratoxigenic profile

OTA production in culture medium

The OTA production ability of the strains was evaluated as described previously by Bragulat *et al.* (2001). Strains were inoculated in CYA medium (containing 1 g of K_2HPO_4, 10 ml of Czapek concentrate, 1 ml of trace metal solution, 5 g of yeast extract, 30 g of sucrose, 15 g of agar and water up to 1 l) and incubated at 25°C for 7 days. Three agar plugs (3 mm) of the fungal colony grown in the medium were taken along the radius from the inoculum point and placed in a vial with 1 ml of methanol. After 60 min, the extract was filtered through a membrane filter (Syringe filters, 17 mm, 0·45 μm, nylon membranes, TITAN) and submitted to a high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The assay was carried out by duplicate.

OTA detection and quantification

The HPLC apparatus used for determination of OTA was a Hewlett-Packard (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) chromatograph with a loop of 50 μl, equipped with a fluorescence detector (λexc = 330 nm and λem = 460) and a C18 column (150 × 4·6 mm, 5 μm particle size; Supelcosil LC-ABZ, Supelco, Bellefonte, PA, USA), connected to a precolumn (20 × 4·6 mm, 5 μm particle size; Supelguard LC-ABZ). The mobile phase was pumped at 1·0 ml min^{-1} and consisted of an isocratic system composed: acetonitrile, water, and acetic acid (99 : 99 : 2). OTA was quantified on the basis of HPLC fluorometric response compared with the OTA standard.

AFLP analysis

Fungal strains

Eighty-eight strains were selected at random for identification at species level by amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. The strains examined are listed in Table 2. *Aspergillus niger* FRR 5722, *Aspergillus awamori* FRR 5804, *Aspergillus tubingensis* FRR 5720, *Aspergillus carbonarius* FRR 5690, *Aspergillus japonicus*

© 2010 The Authors

ITEM 7034 and *Aspergillus aculeatus* ITEM 7046 were included as *ex*-type strains.

Nucleic acid extraction

A suspension of spores from each fungal strain was grown in Wickerham medium containing 40 g of glucose, 5 g of peptone, 3 g of yeast extract, 3 g of malt extract and water up to 1 l. The Erlenmeyer flasks were incubated on an orbital shaker at 1·26 g at 25 ± 1°C. Mycelia from 3-day-old cultures were harvested by filtration through nongauze milk filters (Ken AG, Ashland, OH, USA), excess water was removed by blotting mycelia between clean paper towels, and dried mycelia were stored frozen at −20°C until ground. Fungal DNA was extracted with the cetyltrimethylammonium bromide method developed by Murray and Thompson (1980) and modified by Kerényi *et al.* (1999).

AFLP reactions

AFLP reactions were performed as described by Vos *et al.* (1995) and modified by Zeller *et al.* (2000) in a PTC-2000 Thermal Cycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). All buffers and DNA-modifying enzymes were used following either the manufacturer's instructions or standard protocols (Sambrook *et al.* 1989). Genomic DNAs were digested to completion with *Eco*RI and *Mse*I and ligated to AFLP adapters overnight at room temperature (21–24°C). The digested and ligated templates were diluted in nine volumes of Tris–EDTA buffer prior to preamplification. Samples were preamplified under the following cyclic conditions: initial denaturation at 94°C for 60 s, followed by 20 cycles consisting of 30 s at 94°C, 60 s at 56°C and 60 s at 72°C, and a final extension step of 72°C for 5 min, and then held at 4°C indefinitely. Preamplified reactions were diluted 1 : 50 with H_2O prior to final specific AFLP amplification. Two primer pair combinations (*Eco*RI + TG/*Mse*I + CG; *Eco*RI + AT/*Mse*I + CG) were used. *Eco*RI primers for specific amplification were end-labelled [γ^{-33} P] ATP. For final specific AFLP reactions, 1·3 μl of diluted preamplification reactions was used, and the final volume was 5 μl. The PCR program for the AFLP amplification was as follows: one cycle of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s and 72°C for 30 s; then, this cycle was followed by a 12-cycle step-down protocol in which the annealing temperature was lowered each cycle by 0·7°C from 65 to 56°C. After that, 23 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 60 s were performed, followed by a final extension step of 72°C for 5 min and then held at 4°C.

AFLP fragments were separated in denaturing 6% polyacrylamide gels (Long Ranger gel solution; BMA, Rockland, ME, USA) with 1× Tris-borate EDTA buffer (pH 8·0) in both the gels and the running buffer. Gels were run at a constant power of 60 W until the xylene cyanol (Sigma, St Louis, MO, USA) marker had run approximately 22 cm. After that, the gels were transferred to a 3-mm gel-blotting paper (Midwest Scientific, Valley Park, MO, USA) and dried before exposure to X-ray film at room temperature (Classic Blue Sensitive; Midwest Scientific) for 3–7 days to resolve banding patterns. Band sizes were estimated on polyacrylamide gels against [γ^{-33} P] ATP-labeled BRL low-mass ladder (Life Technologies, Rockville, MD, USA). The presence or absence of polymorphic AFLP bands was scored manually and the data recorded in a binary format. All polymorphic bands in this size range were scored, including those assumed to be homologous and to represent the same allele and locus. Each scored band of differing mobility was treated as a single independent locus with two alleles (present or absent).

Genetic distance and cluster analysis of AFLP data

To estimate the genetic distance between individuals, similarity coefficients (S) were calculated using the formula: $S = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, where N_x represents the number of fragments amplified in isolated x and y, respectively, and N_{xy} is the number of fragments shared by the two isolates (Nei and Li 1979). Genetic distance (D) was derived from similarity coefficients as follows: $D = 1 - S$. Genetic distance matrices were constructed for isolates using the compiled AFLP data. Dendrograms were obtained using the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering strategy of the NTSYSPC 2.0 (Numerical Taxonomy System; Applied Biostatistics Inc., New York, NY, USA) software package (Rohlf 1990). The AFLP data were subject to bootstrap analysis with 1000 replications using the program PAUP* ver. 4.0 (Swofford 1999), to determine whether there was significant genetic substructure or clustering among isolates as resolved by AFLP data.

Results

Strain identification and ochratoxigenic profile

The morphological characterization of 538 *Aspergillus* section *Nigri* strains showed that *A. niger* 'aggregate' represented the most common species (81% in 2006/07 and 87% in 2007/08), followed by *Aspergillus carbonarius* (12% in 2006/07 and 8% in 2007/08). The *Aspergillus* 'uniseriate' species were isolated in lower percentages than those of the other species during both vintages (8% in 2006/07 and 6% in 2007/08).

From the total strains evaluated (n = 275) during the 2006/07 vintage, 32% were OTA producers with levels ranging from 0·5 to 1,285 μg kg^{-1} of Czapek yeast extract agar (CYA) medium. Sixty-nine per cent of the strains was identified as *A. niger* 'aggregate', and the 31%

© 2010 The Authors

remained as *A. carbonarius*. From 263 strains isolated during the 2007/08 vintage, a low percentage was toxigenic (19%), but the OTA levels produced were higher than those produced in the previous vintage and ranged from 0·5 to 7583 $\mu g\ kg^{-1}$. Fifty-nine per cent of the OTA-producer strains was identified as *A. niger* 'aggregate' and the remaining 41% was *A. carbonarius*. The 'uniseriate' *Aspergillus* strains isolated in both periods evaluated were not OTA producers (Table 1).

AFLP analysis

A subset of 88 representative strains selected arbitrarily from the 538 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* was eval-

Table 1 Ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus* section *Nigri* strains

Vintages	Regions	Species	Number of strains OTA-positives/total	OTA range* ($\mu g\ kg^{-1}$)	Mean*
2006/07	La Rioja – Chilecito	*A. niger* aggregate	9/38	0·5–8·4	2·9
		A. carbonarius	19/21	0·5–1,285	207·0
		A. uniseriate	0/15	ND	–
	San Juan – Tulum Valley	*A. niger* aggregate	8/36	0·5–6·7	1·5
		A. carbonarius	6/6	1·2–770·0	196·9
		A. uniseriate	0/3	ND	–
	Mendoza – Uco Valley	*A. niger* aggregate	5/7	0·1–17·5	4·6
		A. carbonarius	–	–	–
		A. uniseriate	–	–	–
	Mendoza North-East	*A. niger* aggregate	4/24	0·5–17·8	5·1
		A. carbonarius	2/2	37·0–501·3	269·2
		A. uniseriate	0/2	ND	–
	Mendoza ZARM†	*A. niger* aggregate	11/22	0·5–4·2	1·8
		A. carbonarius	1/1	2·9	2·9
		A. uniseriate	0/1	ND	–
	Mendoza South	*A. niger* aggregate	7/20	0·5–3·6	2·2
		A. carbonarius	0/1	ND	–
		A. uniseriate	–	–	–
	Neuquén – Río Negro	*A. niger* aggregate	14/75	0·5–12·1	2·4
		A. carbonarius	–	–	–
		A. uniseriate	0/1	ND	–
2007/08	La Rioja – Chilecito	*A. niger* aggregate	9/26	0·7–2590	310·0
		A. carbonarius	9/9	30·1–3214	1139
		A. uniseriate	0/11	ND	–
	San Juan – Tulum Valley	*A. niger* aggregate	2/31	5·0–60·5	32·8
		A. carbonarius	8/8	10·0–7583	1605
		A. uniseriate	–	–	–
	Mendoza – Uco Valley	*A. niger* aggregate	1/20	3·9	3·9
		A. carbonarius	–	–	–
		A. uniseriate	–	–	–
	Mendoza North-East	*A. niger* aggregate	4/40	0·3–50·8	15·1
		A. carbonarius	–	–	–
		A. uniseriate	–	–	–
	Mendoza ZARM†	*A. niger* aggregate	6/34	0·3–5·4	1·4
		A. carbonarius	–	–	–
		A. uniseriate	0/1	ND	–
	Mendoza South	*A. niger* aggregate	3/47	11·3–20·5	15·2
		A. carbonarius	1/1	7356	7356
		A. uniseriate	0/1	ND	–
	Neuquén – Río Negro	*A. niger* aggregate	1/34	36·6	36·6
		A. carbonarius	–	–	–
		A. uniseriate	–	–	–

ND, not detected.
Detection limit: 0·05 $\mu g\ kg^{-1}$.
*Range and mean of OTA-positive strains data.
†ZARM: high area near the Mendoza river.

© 2010 The Authors

uated using AFLP markers. Two selective primer pair combinations (*Eco*RI+TG/*Mse*I+CG and *Eco*RI+AT/*Mse*I+CG) turned out to produce a complex, well-resolved fingerprint pattern. The region of approximately 100–400 pb was considered for similarity calculation and subsequent graphical visualization. Polymorphisms both within and between species were obtained for each of the two primer pairs. The identification of 107 distinct and scoreable bands allowed the construction of 88 isolates × 107 loci data matrix, which was analysed and used to produce a dendrogram (Fig. 1). The resultant UPGMA dendrogram allowed the comparison among the haplotypes and showed a clear separation of four groups: *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger* 'aggregate' and *Aspergillus* 'uniseriate'. The similarity among strains from different clusters was <25%. The strains were assigned to a species if they shared more than 50% of the bands with the *ex*-type strain. Out of the total strains analysed, 16 belonged to *A. carbonarius*, 44 to *A. tubingensis*, 12 to *A. niger* 'aggregate' and 6 to *Aspergillus* 'uniseriate'. Ten strains were not assigned readily to any of the *ex*-type strains included in the study. However, these strains were grouped and showed a higher degree of similarity with *A. tubingensis ex*-type strain (45%), so they were considered as *A. tubingensis* 'atypical' or a closely related species. The description of the four cluster identified is reported later and showed in Fig. 1 and Table 2.

Aspergillus 'uniseriate'
This cluster showed low homology (42%) and high internal heterogeneity. Five strains clustered with *Aspergillus japonicus* ITEM 7034, 3 showed a similarity of 37% and in particular, ASNRC 84 strain a similarity of 52%. Two strains were grouped with *A. aculeatus* ITEM 7046 *ex*-type with a similarity of 61%. None of the strains evaluated produced detectable OTA levels.

Aspergillus tubingensis
The largest number of the strains ($n = 38$) showed a similarity of 68% with *A. tubingensis* FRR 5720 *ex*-type strain. Six strains formed other branches, three were not grouped with other strains, and the rest formed one smaller group with a similarity of 60% among them. The strains included in this cluster were not previously identified as *A. tubingensis* by morphological criteria. Twelve of the 46 strains produced detectable levels of ochratoxin A.

Aspergillus carbonarius
The *A. carbonarius* cluster included the 16 strains identified morphologically as *A. carbonarius*. All the strains clustered at a similarity value of 81% with the *A. carbonarius* FRR 5690 *ex*-type strain, while, among them, shared 90% of the bands. In particular, six strains were grouped with the *ex*-type strain with 100% of homology. All the strains were OTA producers with variable production levels.

Aspergillus niger 'aggregate'
Twelve strains clustered with a similarity value ranging from from 42 to 90% with *A. niger* FRR 5722 *ex*-type strain, and from 36 to 82% with *A. awamori* FRR 5804 *ex*-type strain. This group was considered as *A. niger* 'aggregate' cluster as there was no distinctive homology with any of the two ex-types previously mentioned. All strains analysed were morphologically undistinguished from the strains included in *A. tubingensis* cluster. Two of the 12 strains in this group produced detectable OTA levels.

Discussion

In a previous study, we have found that species within *Aspergillus* section *Nigri* were frequently isolated in the vineyards of the different grape-growing regions in Argentina (Chiotta *et al.* 2009). The morphological identification showed that *A. niger* 'aggregate' species were the most prevalent, followed by *A. carbonarius* and *Aspergillus* 'uniseriate'. However, at present there are no studies on molecular characterization of the black aspergilli populations from wine grapes in Argentina and AFLP analysis provided a useful tool to determine the diversity of the strains isolated.

The AFLP results showed that *Aspergillus* section *Nigri* populations were heterogeneous and represented mainly by four well-defined groups including *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger* 'aggregate' and *A.* 'uniseriate'. *A. carbonarius* species was distinguished morphologically, and by molecular analysis could be clearly separated forming a homogeneous group. In contrast, the strains included in *A. niger* 'aggregate' group were not differentiated using morphological criteria and the AFLP markers allowed for the separation into *A. niger* 'aggregate' and *A. tubingensis* clusters. The strains included in *A. niger* 'aggregate' cluster showed a high degree of genetic diversity and had no distinctive homology with *A. awamori* or *A. niger* ex-type strains. However, the *A. tubingensis* cluster could be clearly differentiated from *A. niger* 'aggregate' cluster and was represented by the most of the strains isolated. In addition, ten strains were included in this cluster and showed low homology with *A. tubingensis* FRR 5720 *ex*-type strain, thus supporting the possible presence of atypical strains or a closely related species within *A. tubingensis* group. Previously, *A. tubingensis* species have not been described in vineyards from Argentina, and considering its OTA profile, the characterization of this species is relevant.

Although AFLP markers allowed the separation of uniseriate species from the other clusters, these markers

© 2010 The Authors

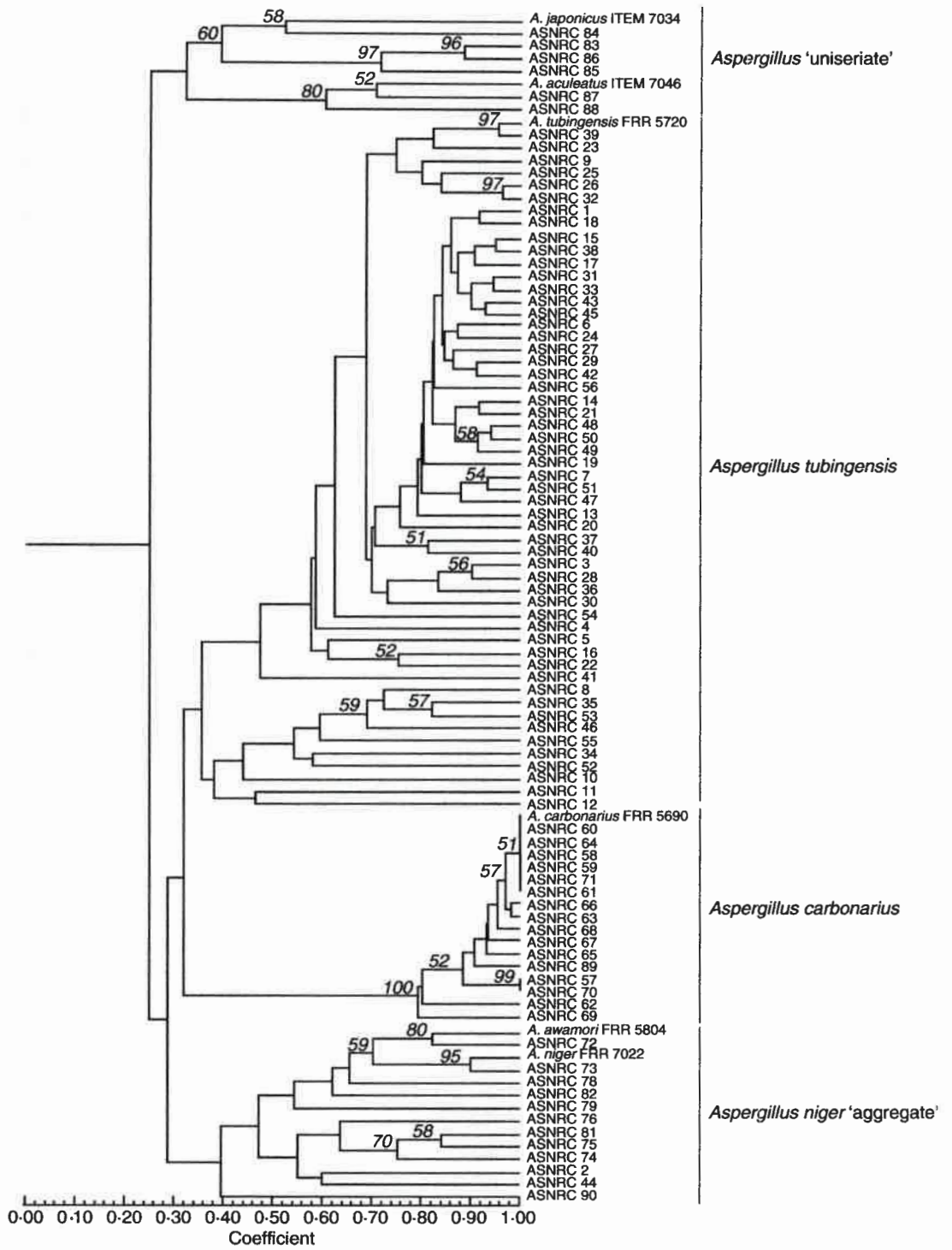


Figure 1 Dendrogram showing genetic relatedness of the *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from Argentinean vineyards based on UPGMA analysis.

were not useful to discriminate the strains included in the 'uniseriate' cluster at species level. The high diversity in this cluster is possibly because of the presence of other species such as *A. uvarum* or *A. aculeatinus*. Therefore, further studies will be needed to clarify the results.

© 2010 The Authors

Table 2 Origin and ochratoxin A (OTA) production of *Aspergillus* section *Nigri* strains included in AFLP analysis

Strain	Species	Origin	OTA	Vintage
ASNRC 84	*A.* 'uniseriate'	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 83	*A.* 'uniseriate'	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 86	*A.* 'uniseriate'	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 85	*A.* 'uniseriate'	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 87	*A.* 'uniseriate'	Mendoza – ZARM	nd	2006/07
ASNRC 88	*A.* 'uniseriate'	Mendoza – ZARM	nd	2006/07
ASNRC 39	*A. tubingensis*	Mendoza – South	nd	2006/07
ASNRC 23	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 9	*A. tubingensis*	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 25	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 26	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 32	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	nd	2007/08
ASNRC 1	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2006/07
ASNRC 18	*A. tubingensis*	Mendoza – Uco Valley	nd	2007/08
ASNRC 15	*A. tubingensis*	Mendoza – Uco Valley	+	2006/07
ASNRC 38	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	nd	2006/07
ASNRC 17	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	nd	2006/07
ASNRC 31	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	nd	2006/07
ASNRC 33	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	+	2006/07
ASNRC 43	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	LD	2007/08
ASNRC 45	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	nd	2007/08
ASNRC 6	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	nd	2007/08
ASNRC 24	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 27	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 29	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	nd	2006/07
ASNRC 42	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	nd	2007/08
ASNRC 56	*A. tubingensis*	San Juan	+	2007/08
ASNRC 14	*A. tubingensis*	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 21	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 48	*A. tubingensis*	San Juan	nd	2006/07
ASNRC 50	*A. tubingensis*	San Juan	nd	2006/07
ASNRC 49	*A. tubingensis*	San Juan	+	2006/07
ASNRC 19	*A. tubingensis*	Neuquén – Río negro	+	2006/07
ASNRC 7	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	nd	2007/08
ASNRC 51	*A. tubingensis*	San Juan	nd	2006/07
ASNRC 47	*A. tubingensis*	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 13	*A. tubingensis*	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 20	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	nd	2007/08
ASNRC 37	*A. tubingensis*	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 40	*A. tubingensis*	Mendoza – South	nd	2007/08
ASNRC 3	*A. tubingensis*	Mendoza – North-East	+	2006/07
ASNRC 28	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	nd	2006/07
ASNRC 36	*A. tubingensis*	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 30	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	+	2006/07
ASNRC 54	*A. tubingensis*	San Juan	nd	2007/08
ASNRC 4	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	+	2007/08
ASNRC 5	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	nd	2007/08
ASNRC 16	*A. tubingensis*	La Rioja	+	2006/07
ASNRC 22	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	+	2006/07
ASNRC 41	*A. tubingensis*	Neuquén-Río negro	nd	2007/08
ASNRC 8	*A. tubingensis* 'atypical'	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 35	*A. tubingensis* 'atypical'	San Juan	nd	2006/07
ASNRC 53	*A. tubingensis* 'atypical'	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 46	*A. tubingensis* 'atypical'	San Juan	+	2006/07
ASNRC 55	*A. tubingensis* 'atypical'	San Juan	nd	2007/08
ASNRC 34	*A. tubingensis* 'atypical'	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 52	*A. tubingensis* 'atypical'	San Juan	+	2006/07

© 2010 The Authors

Table 2 (*Continued*)

Strain	Species	Origin	OTA	Vintage
ASNRC 10	*A. tubingensis* 'atypical'	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 11	*A. tubingensis* 'atypical'	La Rioja	nd	2006/07
ASNRC 12	*A. tubingensis* 'atypical'	La Rioja	nd	2007/08
ASNRC 60	*A. carbonarius*	San Juan	+	2007/08
ASNRC 64	*A. carbonarius*	La Rioja	++	2006/07
ASNRC 58	*A. carbonarius*	San Juan	++	2006/07
ASNRC 59	*A. carbonarius*	San Juan	++	2006/07
ASNRC 71	*A. carbonarius*	La Rioja	++	2007/08
ASNRC 89	*A. carbonarius*	San Juan	+	2007/08
ASNRC 66	*A. carbonarius*	La Rioja	+++	2006/07
ASNRC 63	*A. carbonarius*	San Juan	++++	2007/08
ASNRC 68	*A. carbonarius*	La Rioja	+++	2007/08
ASNRC 67	*A. carbonarius*	La Rioja	++	2006/07
ASNRC 65	*A. carbonarius*	La Rioja	+	2006/07
ASNRC 89	*A. carbonarius*	La Rioja	+	2006/07
ASNRC 57	*A. carbonarius*	San Juan	+++	2006/07
ASNRC 70	*A. carbonarius*	La Rioja	+	2007/08
ASNRC 62	*A. carbonarius*	San Juan	++++	2007/08
ASNRC 69	*A. carbonarius*	La Rioja	+	2007/08
ASNRC 72	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – ZARM	+	2006/07
ASNRC 73	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – ZARM	nd	2006/07
ASNRC 78	*A. niger* 'aggregate'	Neuquén – Río Negro	nd	2007/08
ASNRC 82	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – Uco Valley	nd	2007/08
ASNRC 79	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – Noeste	nd	2006/07
ASNRC 76	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – ZARM	nd	2007/08
ASNRC 81	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – Uco Valley	nd	2007/08
ASNRC 75	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – ZARM	nd	2006/07
ASNRC 74	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – ZARM	nd	2006/07
ASNRC 2	*A. niger* 'aggregate'	Mendoza – ZARM	nd	2007/08
ASNRC 44	*A. niger* 'aggregate'	Neuquén-Río negro	nd	2007/08
ASNRC 90	*A. niger* 'aggregate'	San Juan	+	2006/07
Reference strains				
FRR 7022	*A. niger*			
FRR 5804	*Aspergillus awamori*			
FRR 5720	*Aspergillus tubingensis*			
FRR 5690	*Aspergillus carbonarius*			
ITEM 7034	*Aspergillus japonicus*			
ITEM 7046	*Aspergillus aculeatus*			

ND, not detected.
Detection limit: 0·05 μg kg^{-1}.
OTA levels: +, <100; ++, 100–1000; +++, 1000–5000; ++++, >5000 μg kg^{-1}.

In summary, our results are consistent with Perrone *et al.* (2006b) who studied the black aspergilli populations from European vineyards using AFLP analysis. In addition, similar data were obtained using other molecular markers such as rep-PCR (Palencia *et al.* 2009), ITS-RFLP (Martínez-Culebras and Ramón 2007) and RFLP (Bau *et al.* 2006).

Several molecular methods were employed in an attempt to distinguish between ochratoxin producer and nonproducer strains within *Aspergillus* section *Nigri* (Geiser *et al.* 2007). In our study, AFLP analysis was ineffective in separating toxigenic from nontoxigenic strains, because both types of strains were intermixed within the groups. This result agrees with previous studies using AFLPs (Schmidt *et al.* 2004; Perrone *et al.* 2006b; Oliveri *et al.* 2008), RAPD-PCR (Dachoupakan *et al.* 2009) and ap-PCR (Martínez-Culebras *et al.* 2009). In contrast, Bau *et al.* (2006) using RFLP analysis grouped *A. niger* aggregate strains in type *N* and *T* and showed that all the OTA producer strains were *N*-RFLP type.

This is the first report in South America where the species belonging to *Aspergillus* section *Nigri* isolated from grapes were characterized by a genetic study. Molecular markers were useful for the identification of black aspergilli strains and particularly *A. tubingensis* species could be differentiated from *A. niger* 'aggregate' group.

© 2010 The Authors

However, a sequence-based analysis will be necessary to widen these results and furthermore to characterize the population belonging to the group of strains assigned as atypical of closely related species.

Acknowledgements

This work was supported by grants from ANPCyT (FONCYT), PICT 25522 and SECyT (Secretaría de Ciencia y Técnica), Universidad Nacional de Río Cuarto. Mic. M.L. Chiotta has fellowship from CONICET and M.M. Reynoso, A.M. Torres and S.N. Chulze are members of the Research Career of CONICET.

References

Barros, G.G., Chiotta, M.L., Reynoso, M.M., Torres, A.M. and Chulze, S.N. (2007) Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. *J Appl Microbiol* **103**, 900–909.

Battilani, P., Magan, N. and Logrieco, A. (2006a) European research on ochratoxin A in grapes and wine. *Int J Food Microbiol* **111**, 2–4.

Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z. and Magan, N. (2006b) Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *Int J Food Microbiol* **111**, 72–82.

Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S. and Cabañez, F.J. (2005) Ochratoxigenic species from Spanish wine grape. *Int J Food Microbiol* **98**, 125–130.

Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M.R. and Cabañes, F.J. (2006) RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *Int J Food Microbiol* **111**, 18–21.

Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A.J. (2004) Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *Int J Food Microbiol* **96**, 19–27.

Bellí, N., Bau, M., Marin, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J. and Bragulat, M.R. (2006) Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *Int J Food Microbiol* **111**, 40–45.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabañes, F.J. (2001) An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol* **71**, 139–144.

Castella, G., Larsen, T.O., Cabañes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P. and Geisen, R. (2002) Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Syst Appl Microbiol* **25**, 74–83.

Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M. and Chulze, S.N. (2009) *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine grape growing regions in Argentina. *Int J Food Microbiol* **136**, 137–141.

Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Torres, A.M. and Leslie, J.F. (2000) Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5312–5315.

Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E. and Dalcero, A.M. (2002) Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit Contam* **19**, 408–414.

Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. and Schorr-Galindo, S. (2009) Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *Int J Food Microbiol* **132**, 14–23.

EFSA (2006) European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J* **365**, 1–56. http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/365.pdf. Accessed 5 September 2007.

Frisvad, J.C., Lund, F. and Elmholt, S. (2005) Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *J Appl Microbiol* **98**, 684–692.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. and Samson, R.A. (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* **59**, 1–10.

IARC (1993) Ochratoxin A. Summary of data reported and evolution. In: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, Vol. 56. pp. 489–521. Lyon: IARC.

Kerényi, Z., Zeller, K., Hornok, L. and Leslie, J.F. (1999) Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4071–4076.

Klich, M.A. (2002) *Identification of Common Aspergillus species*. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voorschimmelculturs.

Leong, S.L. (2007) Fungi in wine – implications of vineyard infections. In *Food Mycology: a Multifaceted Approach to Fungi and food* ed. Dijksterhuis, J. and Samson, R.A. pp. 303–318 Boca Raton: CRC Press.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W. and Scott, E.S. (2006) Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *Int J Food Microbiol* **111**, 10–17.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. and Dalcero, A. (2003) Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Lett Appl Microbiol* **37**, 179–184.

© 2010 The Authors

Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Lamprecht, S.C., Zeller, K.A. and Leslie, J.F. (2001) *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia* **93**, 1203–1210.

Martínez-Culebras, P.V. and Ramón, D. (2007) An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *Int J Food Microbiol* **113**, 147–153.

Martínez-Culebras, P.V., Crespo-Sempere, A., Sánchez-Hervás, M., Elizaquivel, P., Aznar, R. and Ramón, D. (2009) Molecular characterization of the black *Aspergillus* isolates responsible for ochratoxin A contamination in grapes and wine in relation to taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri*. *Int J Food Microbiol* **132**, 33–41.

Montiel, D., Dickinson, M.J., Lee, H.A., Dyer, P.S., Jeenes, D.J., Roberts, I.N., James, S. and Fuller, L.J. (2003) Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints. *Mycol Res* **107**, 1427–1434.

Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4321–4325.

Nei, M. and Li, W.-H. (1979) Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 5269–5273.

Oliveri, C., Torta, L. and Catara, V. (2008) A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. *Int J Food Microbiol* **127**, 147–154.

Palencia, E.R., Klich, M.A., Glenn, A.E. and Bacon, C.W. (2009) Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. *J Microbiol Methods* **79**, 1–7.

Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. and Logrieco, A. (2006a) Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Appl Environ Microbiol* **72**, 680–685.

Perrone, G., Susca, A., Epifani, F. and Mulè, G. (2006b) AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. *Int J Food Microbiol* **111**, 22–27.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A. and Chulze, S. (2007) Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *Int J Food Microbiol* **114**, 131–135.

Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Zeller, K.A., Torres, A.M. and Leslie, J.F. (2009) Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *Eur J Plant Pathol* **123**, 207–215.

Rohlf, F.J. (1990) Fitting curves to outlines. In *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop* ed. Rohlf, F.J. and Bookstein, F.L. Museum of Zoology special publication no. 2. pp. 167–177. Michigan, USA: University of Michigan.

Sage, L., Garon, D. and Seigle-Murandi, F. (2004) Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *J Agric Food Chem* **52**, 5764–5768.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmidt, H., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H. and Niesen, L. (2004) Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in a green coffee samples. *J Appl Microbiol* **97**, 899–909.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. and Venancio, A. (2003) Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int J Food Microbiol* **88**, 63–68.

Swofford, D. (1999) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0.* Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Treadway, L.P., White, J.F. Jr, Gaut, P.S., Reddy, P.V., Richardson, M.D. and Clarke, B.B. (1999) Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. *Mycol Res* **103**, 1593–1603.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G. and Solfrizzo, M. (2008) Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit Contam* **25**, 193–202.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A. and Pot, J. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407–4414.

Zeller, K.A., Jurgenson, J.A., El-Assiuty, E.M. and Leslie, J.F. (2000) Isozyme and amplified fragment length polymorphism (AFLPs) from *Cephalosporium maydis* in Egypt. *Phytoparasitica* **28**, 121–130.

Zeller, K.A., Bowden, R.L. and Leslie, J.F. (2003) Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quad-rats in Kansas and North Dakota. *Phytopathology* **93**, 874–880.

Zeller, K.A., Bowden, R.L. and Leslie, J.F. (2004) Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from United States. *Mol Ecol* **13**, 563–571.

Zimmerli, B.A. and Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grapejuice: occurrence and risk assessment. *Food Addit Contam* **13**, 655–668.

© 2010 The Authors

International Journal of Food Microbiology 149 (2011) 171–176

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Short Communication

Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina

M.L. Chiotta [a], A. Susca [b], G. Stea [b], G. Mulè [b], G. Perrone [b], A. Logrieco [b], S.N. Chulze [a,*,1]

[a] Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina
[b] Institute of Sciences of Food Production (ISPA), CNR, Bari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 March 2011
Received in revised form 26 May 2011
Accepted 9 June 2011
Available online 14 June 2011

Keywords:
Aspergillus section *Nigri*
Grapes
Ochratoxin A
Fumonisins
Sequencing

ABSTRACT

Aspergillus section *Nigri* populations isolated from seven growing regions from Argentina were characterized by sequencing in order to identify species responsible for production of ochratoxin A (OTA) and fumonisins (FB_s). Sequences of genes encoding calmodulin, β-tubulin, the second largest subunit of RNA polymerase II and translation elongation factor 1 alpha were analysed. The phylogenetic analysis showed the presence of six lineages: *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. japonicus*, *A. homomorphus* and *A. foetidus* grouped in four major clusters. The molecular tools used allowed the identification for the first time of *A. homomorphus* from vineyards. OTA production confirmed the importance of *A. carbonarius* as the main ochratoxigenic species isolated and, to a variable degree, of *A. niger* and *A. tubingensis*, which were by far the most commonly occurring species on grapes in Argentina. The only strains able to produce OTA and fumonisins (B_2–B_4) belong to the *A. niger* cluster.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aspergillus section *Nigri* are commonly isolated in vineyards and include species, mainly *A. carbonarius* and *A. niger* aggregate, responsible for ochratoxin A (OTA) contamination of grapes and wines (Visconti et al., 2008). The percentage of *A. carbonarius* strains able to produce OTA is higher than that found among members of the *A. niger* aggregate. However, in vineyards the higher incidence of species belonging to the *A. niger* aggregate can also contribute to OTA contamination to a varying degree (Battilani et al., 2006; Leong, 2007; Ponsone et al., 2007). Molecular studies have shown that within the *A. niger* aggregate, *A. tubingensis* and *A. niger* are the most frequent potentially ochratoxigenic species isolated in European vineyards (Bau et al., 2006; Perrone et al., 2006a). Besides OTA production, fumonisin production by *A. niger* strains and the natural occurrence of fumonisin in must have been demonstrated recently (Frisvad et al., 2007; Pel et al., 2007; Logrieco et al., 2010; Mansson et al., 2010). Fumonisins have been associated with leukoencephalomalacia in equine species, pulmonary edema in pigs, and esophageal cancer in humans (FAO, 2001). The European Commission Scientific Committee for Food (2003) has established a provisional maximum tolerable daily intake of 2 μg/kg of body weight per day for FB_1, FB_2, and FB_3, either alone or in combination. Therefore, due to the widespread occurrence of *A. niger* strains on a wide range of food, including grapes, this new potential risk of contamination with fumonisins should be taken in consideration.

The characterization of *Aspergillus* section *Nigri* species has been revised by Samson et al. (2004). Later studies have added new species such as *A. ibericus*, *A. uvarum*, *A. sclerotiicarbonarius* and *A. aculeatinus* (Serra et al., 2006; Noonim et al., 2008; Perrone et al., 2008). The use of a polyphasic approach, which includes DNA sequences, physiological and ecological data as well as extrolite analyses for identification at species level within section *Nigri*, has been also proposed in other current studies (Geiser et al., 2007; Perrone et al., 2007; Samson et al., 2007).

Studies on the grape mycobiota using morphological criteria carried out in Argentina showed that species included within the *A. niger* "aggregate" were the dominant species isolated from the Mendoza grape-growing region (Magnoli et al., 2003; Ponsone et al., 2007). In contrast, *A. carbonarius* and "uniseriate" *Aspergillus* species were mainly isolated from other regions such as La Rioja and San Juan (Chiotta et al., 2009). Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) these species were also identified and *A. tubingensis* was separated from the *A. niger* group (Chiotta et al., 2011). Based on these previous findings, it was considered relevant to confirm the biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from Argentinean vineyards using a multilocus genealogical approach; so calmodulin, β-tubulin, the second largest subunit of RNA polymerase II and translation elongation factor 1 alpha were considered. The ochratoxin A and fumonisin production ability of the strains was evaluated in order to understand the potential toxicological risk in grapes.

* Corresponding author at: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional No. 36 Km 601 (5800), Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
E-mail address: schulze@exa.unrc.edu.ar (S.N. Chulze).
[1] Member of the Research Career of CONICET.

0168-1605/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.002

2. Materials and methods

2.1. Fungal samples

Seventy strains randomly selected during the 2008/09 vintage, together with 29 strains previously isolated and identified by AFLP (Chiotta et al., 2011), were included in the present analysis (Table 1). The morphological identification followed the methodology described by Klich (2002).

2.2. Sequences analysis

For mycelium production, a suspension of spores from each fungal strain was grown in Wickerham medium, containing 40 g glucose, 5 g peptone, 3 g yeast extract, 3 g malt extract and water up to 1 L. Mycelia were filtered and lyophilized for total DNA isolation. The fungal DNA extraction was done with the Wizard Magnetic DNA purification Kit (Promega) with some modifications, starting from 10 mg of lyophilized mycelium. The quality of genomic DNA was determined by electrophoresis and the quantification using a Spectophotometer ND-1000 (Nano Drop).

Amplification of part of the β-tubulin (*benA*), calmodulin (*caM*), the second largest subunit of RNA polymerase II (*rpb2*) and translation elongation factor 1α (*ef-1α*) genes, was performed using Bt2a/Bt2b, CL1/CL2a, E1/E2 and A-EF_F/A-EF_R primers, respectively (Glass and Donaldson, 1995; O'Donnell et al., 2000). PCR reactions were carried out on a thermal cycler 9700 (Applied Biosystems, Ontario, Canada) and the reaction conditions were: denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of the denaturation at 94 °C for 50 s, annealing at 57 °C, 60 °C, 59 °C and 56.5 °C for 50 s for *caM*, *benA*, *ef-1α* and *rpb2*, respectively, extension at 72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 7 min, followed by cooling at 4 °C to develop the next step. After amplification, the products were purified with the enzymatic mixture EXO/SAP (Exonuclease I, *E. coli*/Shrimp Alkaline Phosphatase).

Sequence analysis using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit for both strands was evaluated. The PCR program for the amplification was: one cycle of the denaturation 96 °C for 10 s; 35 cycles of annealing to 50 °C for 5 s, extension at 60 °C for 4 min and then one cycle of held at 4 °C.

All the sequencing reactions were purified by gel filtration through Sephadex G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated in double-distilled water and analyzed on an ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3. OTA production by Aspergillus section Nigri strains

Ochratoxin A production was evaluated in CYA medium (K_2HPO_4, 1 g; Czapek concentrate with trace metals, 10 ml; powdered yeast extract, 5 g; sucrose, 30 g; agar, 15 g and water up to 1 L) according to Bragulat et al. (2001). The strains identified as *A. carbonarius* that did not produce detectable OTA levels in CYA medium were further analyzed using different culture media: Yeast Extract-sucrose broth (YES) containing 2% yeast extract, 15% sucrose, and Potato-dextrose broth (PDB) (Oxoid, Basingstoke, UK). After the incubation period, the cultures were filtered and the extraction of OTA was performed by mixing 100 μl of culture with 900 μl of mobile phase. The extract was filtered again through a nylon membrane filter (0.45 Pm) prior to analysis by HPLC.

The HPLC apparatus used for determination of OTA was a Hewlett-Packard 1100 (Hewlett-Packard company, Palo Alto, CA, USA) chromatograph with a loop of 50 μl, equipped with a fluorescence detector ($\lambda_{exc} = 330$ nm and $\lambda_{em} = 460$) and a C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm particle size; Supelcosil LCABZ, Supelco, Bellefonte, PA, USA). The mobile phase was pumped at 1.0 ml/min, and consisted of an isocratic system comprising: acetonitrile, water, acetic acid (99:99:2).

Table 1
Origin of *Aspergillus* section *Nigri* strains included in this study.

Strain	Species	Origin	Vintage
ITEM 11790	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2006/07
ITEM 11796	*A. tubingensis*	San Juan – Valle del Tulum	2006/07
ITEM 11795	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2007/08
ITEM 11780	*A. tubingensis*	San Juan – Valle del Tulum	2006/07
ITEM 11818	*A. tubingensis*	San Juan – Valle del Tulum	2008/09
ITEM 11821	*A. tubingensis*	San Juan – Valle del Tulum	2008/09
ITEM 11779	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2006/07
ITEM 11782	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2007/08
ITEM 11819	*A. tubingensis*	San Juan – Chilecito	2008/09
ITEM 11813	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11832	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11838	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11856	*A. tubingensis*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11781	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2007/08
ITEM 11868	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11785	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2007/08
ITEM 11847	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11857	*A. tubingensis*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11775	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2006/07
ITEM 11845	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11792	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2006/07
ITEM 11797	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2007/08
ITEM 11773	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2007/08
ITEM 11860	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11799	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2006/07
ITEM 11787	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2007/08
ITEM 11808	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11803	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11823	*A. tubingensis*	San Juan – Chilecito	2008/09
ITEM 11851	*A. tubingensis*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11801	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2007/08
ITEM 11871	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11811	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11853	*A. tubingensis*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11863	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11824	*A. tubingensis*	San Juan – Chilecito	2008/09
ITEM 11840	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11866	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11833	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11834	*A. tubingensis*	Neuquén – ZARM	2008/09
ITEM 11806	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11800	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2007/08
ITEM 11783	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2007/08
ITEM 11798	*A. tubingensis*	San Juan – Chilecito	2006/07
ITEM 11850	*A. tubingensis*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11788	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2007/08
ITEM 11861	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11835	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11784	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2007/08
ITEM 11826	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11812	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11849	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11841	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11794	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2007/08
ITEM 11848	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11814	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11829	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11831	*A. tubingensis*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11807	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11809	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11802	*A. tubingensis*	San Juan – Valle del Tulum	2007/08
ITEM 11810	*A. tubingensis*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11846	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11776	*A. tubingensis*	San Juan – Valle del Tulum	2007/08
ITEM 11852	*A. tubingensis*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11791	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2006/07
ITEM 11865	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11777	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2007/08
ITEM 11837	*A. tubingensis*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11793	*A. tubingensis*	Mendoza – Noreste	2007/08
ITEM 11864	*A. tubingensis*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11843	*A. foetidus*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11844	*A. niger*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11867	*A. niger*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11786	*A. niger*	Mendoza – ZARM	2006/07
ITEM 11854	*A. niger*	Mendoza – Sur	2008/09

Table 1 (*continued*)

Strain	Species	Origin	Vintage
ITEM 11830	*A. niger*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11842	*A. niger*	Mendoza – Noreste	2008/09
ITEM 11789	*A. niger*	Mendoza – Noreste	2006/07
ITEM 11872	*A. niger*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11855	*A. niger*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11836	*A. niger*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11820	*A. niger*	San Juan – Chilecito	2008/09
ITEM 11828	*A. niger*	Mendoza – ZARM	2008/09
ITEM 11774	*A. niger*	San Juan – Valle del Tulum	2006/07
ITEM 11778	*A. niger*	Mendoza – ZARM	2006/07
ITEM 11825	*A. carbonarius*	San Juan – Chilecito	2008/09
ITEM 11804	*A. carbonarius*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11822	*A. carbonarius*	San Juan – Valle del Tulum	2008/09
ITEM 11816	*A. carbonarius*	San Juan – Valle del Tulum	2008/09
ITEM 11817	*A. carbonarius*	San Juan – Valle del Tulum	2008/09
ITEM 11839	*A. carbonarius*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11869	*A. carbonarius*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09
ITEM 11870	*A. homomorphus*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11805	*A. japonicus*	La Rioja – Chilecito	2008/09
ITEM 11815	*A. japonicus*	Neuquén – Río Negro	2008/09
ITEM 11858	*A. japonicus*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11859	*A. japonicus*	Mendoza – Sur	2008/09
ITEM 11862	*A. japonicus*	Mendoza – Valle de Uco	2008/09

2.4. Fumonisin production by *Aspergillus* strains

Testing for fumonisin production was performed according to the methodology proposed by Frisvad et al. (2007) with some modifications. Czapek Yeast Autolysate with 20% sucrose (CY20S) agar containing 1 g of K_2HPO_4, 10 ml of Czapek concentrate with trace metals, 5 g of powdered yeast extract, 200 g of sucrose, 15 g of agar and water up to 1 L, was used to inoculate black *Aspergillus* strains. The cultures were incubated for 7 days in darkness at 25 °C. Five agar plugs (0.5–0.7 g) were cut from the colony and extracted with a solution of methanol/water (70:30, v/v). Samples were placed for 50 min in an ultrasonic bath, and filtered (RC 0.2 μm, Phenomenex, CA, USA). The extracts were completely dried using a centrifuge evaporator (Savant Instrument, Farmingdale, NY, USA), dissolved in the extracting solution and resuspended at an equivalent agar concentration of 1 g of agar ml^{-1} for LC/MS/MS analysis.

Fumonisins were determined by HPLC Series 200 (Perkin Elmer, Ontario, Canada) with a Gemini 5u C_{18} 110 A column (150×2 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of a gradient system comprising: A, water 0.1% formic acid; and B, CH_3CN/MeOH (80:20, v/v), 0.1% formic acid. The gradient programme was the following: 30% to 100% B (8 min), 100% B (3 min), and 100% to 30% B (3 min), at a constant flow of 0.2 ml min^{-1}. The injection volume was 20 μl. MS/MS analyses of FB_2 and FB_4 were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with a turbo-ion-spray source.

3. Results

The nucleotide sequence data obtained by the alignment of the four loci were 536 (*caM*), 430 (*benA*), 694 (*ef-1α*) and 1083 bp (*rpb2*), respectively. Considering the 2743 nucleotides sequenced, 32.2% were variable characters, and 28.1% were parsimony informative in the different strains of black Aspergilli. The lowest number was 101 parsimony informative sites/characters in *EF-1α* region, and the highest was 268 in *rpb2* region.

The evolutionary history of the strains was determined by constructing a phylogenetic tree using the distance method Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). The phylogenetic tree obtained with *rpb2* gene showed higher intraspecific variability than in the *benA*, *caM* and *EF-1α* trees. However, sequences of the four genes were analyzed phylogenetically as combined data sets since the trees reflected a similar topology (Fig. 1). Six lineages grouped in four major clusters were identified within the section *Nigri*. Cluster I included the largest number of strains tested ($n=72$) which were grouped together with *A. tubingensis* CBS 134.48 reference strain with a bootstrap of 97%. The strains ITEM 11773, 11775 and 11776, previously considered as *A. tubingensis* "atypical" by AFLP analysis because of its low homology with the reference strain (Chiotta et al., 2011), belonged in the *A. tubingensis* cluster (Fig. 1). Nine strains included in this cluster were positive for OTA production (Table 2). Cluster II was represented by 14 strains identified as *A. niger* by phylogenetic analysis and grouped with the *A. niger* group species, and in particular with *A. awamori* CBS 557.65 reference strain (bootstrap 99%). Within this group, two strains were OTA-producers while five strains were fumonisin producers (FB_2–FB_4). Production levels of FB_2 and FB_4 ranged from 223 to 17,450 and 69.3 to 6955 ng/ml, respectively (Table 2). Fumonisin production was not detected by strains included in the other clusters. Cluster III grouped seven strains of *A. carbonarius* which were clustered with the *A. carbonarius* CBS 556.65 reference strain with a bootstrap of 100%. The *A. carbonarius* strains that had previously showed no OTA production in CYA were able to produce OTA on PDB and YES media. The last cluster included five strains morphologically identified as uniseriate, and by sequencing as *A. japonicus* (bootstrap 100%). The strains grouped in this cluster did not produce OTA.

Two strains ITEM 11843 and ITEM 11870 were identified as *A. foetidus* and *A. homomorphus* having a bootstrap of 99% and 100% with CBS 564.65 and CBS 101889 reference strains, respectively. *A. homomorphus* strain ITEM 11870 was previously identified morphologically as *A. carbonarius* due to the size of its conidia (7 mm). This is the first time that this rarely occurring species has been found in a vineyard.

4. Discussion

The phylogenetic data corroborate the biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations found in a previous study carried out in Argentina using molecular markers (AFLP) (Chiotta et al., 2011). The sequencing results showed that the strains were grouped in four main clusters, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger* and *A. japonicus*. Also two biseriate species, *A. homomorphus* and *A. foetidus*, were identified. The presence of *A. foetidus* has been previously observed in grapes in Argentina; although, the identity of this species was never confirmed using molecular methods (Chulze et al., 2006; Ponsone et al., 2007). Only one strain was identified as *A. homomorphus* and its isolation is relevant because it is the first time that it has been found in vineyards and in Argentina. This species is distinguished from the other black Aspergilli by its extrolite profile and it is unique in the production of dehydrocarolic acid (Samson et al., 2007).

The species belonging to the *A. niger* aggregate were separated in two main clusters, *A. tubingensis* and *A. niger*. Three strains considered atypical by AFLP in a previous study were included in the analysis and were grouped together with the *A. tubingensis* reference strain, confirming their identification. These results are consistent with data obtained in European vineyards by AFLP analysis and sequencing of the β-tubulin, calmodulin and rRNA genes (Perrone et al., 2006b). Similar data were obtained using other molecular markers such as rep-PCR (Palencia et al., 2009), ITS-RFLP (Martinez-Culebras and Ramon, 2007) and RFLP (Oliveri et al., 2008), together with the sequencing of genes. The ability to differentiate *A. tubingensis* from *A. niger* through molecular analysis offers the possibility of assessing the ecophysiological characteristics of these species in order to determine if the strains have some particular ecological feature and/or toxin production. The high frequency of isolation of *A. tubingensis* in this study suggests a major adaptation to the grape agro-ecosystem of this species; this result is also in agreement with European data (Perrone et al., 2006a; Martínez-Culebras et al., 2009). All 14 strains grouped in the *A. niger* cluster

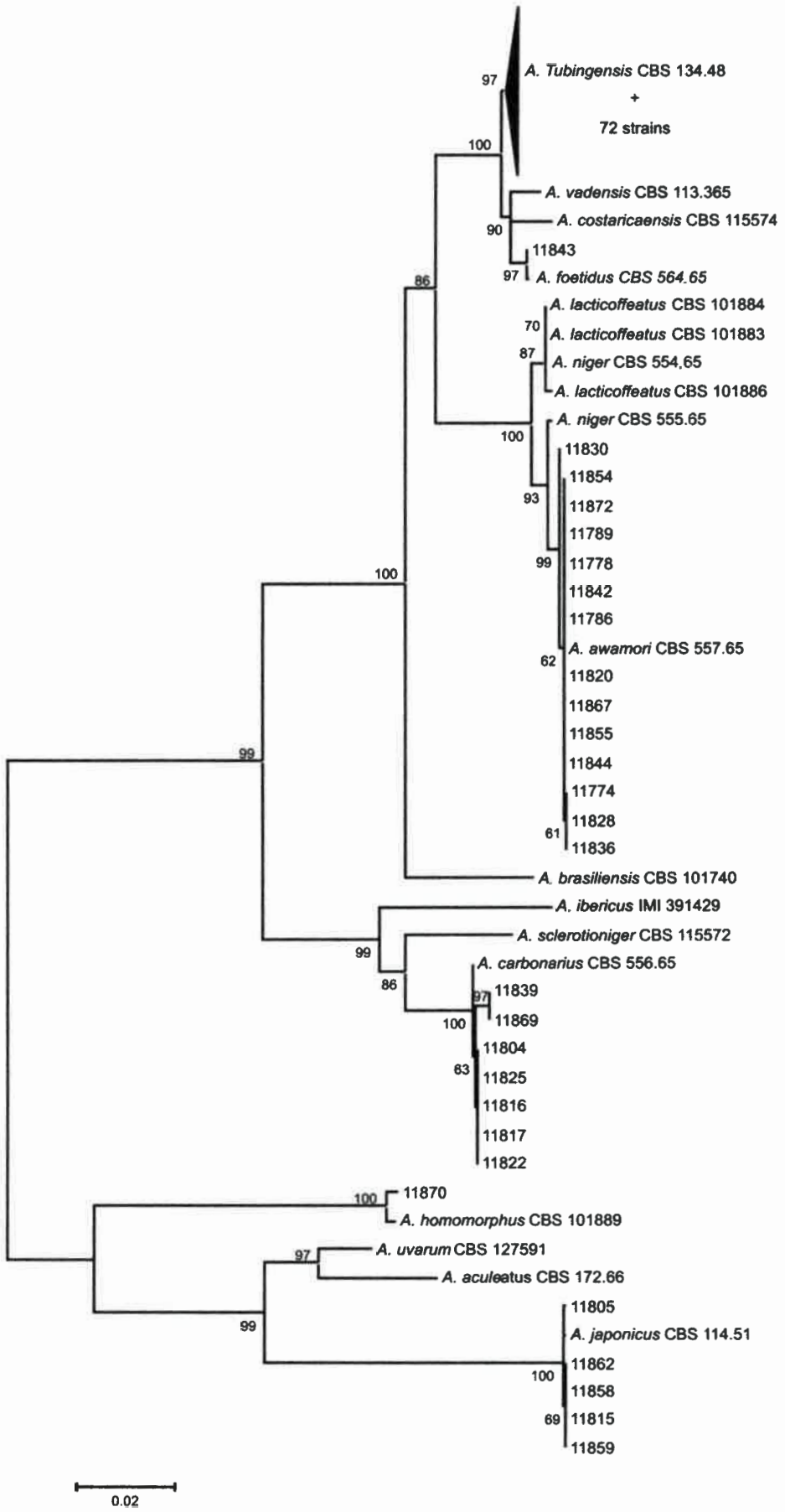

A. Tubingensis CBS 134.48
+
72 strains
A. vadensis CBS 113.365
A. costaricaensis CBS 115574
11843
A. foetidus CBS 564.65
A. lacticoffeatus CBS 101884
A. lacticoffeatus CBS 101883
A. niger CBS 554.65
A. lacticoffeatus CBS 101886
A. niger CBS 555.65
11830
11854
11872
11789
11778
11842
11786
A. awamori CBS 557.65
11820
11867
11855
11844
11774
11828
11836
A. brasiliensis CBS 101740
A. ibericus IMI 391429
A. sclerotioniger CBS 115572
A. carbonarius CBS 556.65
11839
11869
11804
11825
11816
11817
11822
11870
A. homomorphus CBS 101889
A. uvarum CBS 127591
A. aculeatus CBS 172.66
11805
A. japonicus CBS 114.51
11862
11858
11815
11859
0.02

Table 2
Toxigenic capacity of *Aspergillus* section *Nigri* strains.

	Species	Strain	F B_2/B_4 levels on CY20S (ng/ml)	OTA levels on CYA (ng/g)
Cluster I	*A. tubingensis*	ITEM 11796	–	7.0
	A. tubingensis	ITEM 11868	–	27.5
	A. tubingensis	ITEM 11811	–	28.4
	A. tubingensis	ITEM 11800	–	2.0
	A. tubingensis	ITEM 11861	–	34.2
	A. tubingensis	ITEM 11812	–	27.0
	A. tubingensis	ITEM 11794	–	2.0
	A. tubingensis	ITEM 11802	–	1.2
	A. tubingensis	ITEM 11810	–	26.5
Cluster II	*A. niger*	ITEM 11842	17,450.0–6955.2	–
	A. niger	ITEM 11789	16,600.0–5212.0	–
	A. niger	ITEM 11872	11,350.0–3014.4	–
	A. niger	ITEM 11855	8,060.0–861.1	295.4
	A. niger	ITEM 11820	223.5–69.3	–
	A. niger	ITEM 11774	–	2.0
Cluster III	*A. carbonarius*	ITEM 11825	–	2.4[a]
	A. carbonarius	ITEM 11804	–	515.0
	A. carbonarius	ITEM 11822	–	9.6
	A. carbonarius	ITEM 11816	–	204.3
	A. carbonarius	ITEM 11817	–	1.9[a]
	A. carbonarius	ITEM 11839	–	2.9[a]
	A. carbonarius	ITEM 11869	–	275.3

[a] OTA production in PDB medium (ng/ml).

belonged to *A. awamori*, which was recently considered as a cryptic phylogenetic species within the *A. niger* group (Perrone et al., in press).

The *Aspergillus carbonarius* and *A. japonicus* clusters could be clearly separated forming two homogeneous groups. In addition, the *A. japonicus* cluster showed high association with the *A. homomorphus* strain. This grouping agrees with a previous study where *Aspergillus* section *Nigri* strains were analyzed using the β-tubulin sequence (Samson et al., 2004).

The toxigenic profile of the strains confirmed the important contribution of *A. carbonarius* for OTA contamination in the grape ecosystem. Previous studies carried out in Southern Europe and Israel and in Argentina showed that *A. carbonarius* was the dominant OTA producer, with some *A. niger* aggregate strains producing OTA in lower concentrations (Battilani et al., 2006; Chiotta et al., 2009). These studies also observed an association between the percentage of OTA positive *A. carbonarius* strains, the production levels and the isolation region. Regarding *A. tubingensis*, some strains were OTA producers showing differences in their toxigenic ability. This result agrees with previous studies (Medina et al., 2005; Perrone et al., 2006b), although it is not supported by some other authors (Frisvad et al., 2007; Nielsen et al., 2009). The strains included in the *A. niger* cluster produced both mycotoxins, OTA and FB_s. In this respect they showed a higher production frequency for FB_s (35%) than for OTA (14%). In a study on grapes and raisins, approximately 77% of the strains identified as *A. niger* were able to produce FB_s which was a much greater frequency than OTA production (6-10%) (Battilani et al., 2006; Mogensen et al., 2010). These results are relevant since they demonstrate the presence of fumonisin producing strains in grapes which has not been reported previously in Argentina.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from EC KBBE-2007-222690-2 MYCORED. Part of the work was done during the Short Stay Visit of Mic. M.L. Chiotta at ISPA, Italy. M.L. Chiotta is a fellow from CONICET and S.N. Chulze is member of the Research Career of CONICET. M.L. Chiotta and A. Susca contributed equally to this work.

References

Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z., Magan, N., 2006. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. International Journal of Food Microbiology 1, 72–82.

Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., 2006. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. International Journal of Food Microbiology 111, 18–21.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. International Journal of Food Microbiology 71, 139–144.

Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2009. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine grape growing regions in Argentina. International Journal of Food Microbiology 136, 137–141.

Chiotta, M.L., Reynoso, M.M., Combina, M., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2011. Molecular characterization and toxigenic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from the main grape-growing regions in Argentina. Journal of Applied Microbiology 110, 445–454.

Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. International Journal of Food Microbiology 111, 5–9.

Food, Nutrition (FAO), 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. FAO, Rome. Paper 74.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U., 2007. Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 5, 9727–9732.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Studies in Mycology 59, 1–10.

Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61, 1323–1330.

Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Leong, S.L., 2007. Fungi in wine – implications of vineyard infections. In: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (Eds.), Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. CRC Press, Boca Raton, pp. 303–318.

Logrieco, A., Ferracane, R., Visconti, A., Ritieni, R., 2010. Natural occurrence of fumonisin B_2 in red wine from Italy. Food Additives and Contaminants 27, 136–141.

Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A., 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. Letters in Applied Microbiology 37, 179–184.

Mansson, M., Klejnstrup, M.L., Phipps, R.K., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Gotfredsen, C.H., Larsen, T., 2010. Isolation and NMR characterization of fumonisin B_2 and a new fumonisin B_6 from *Aspergillus niger*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 949–953.

Martínez-Culebras, P.V., Ramon, D., 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. International Journal of Food Microbiology 113, 147–153.

Martínez-Culebras, P.V., Crespo-Sempere, A., Sánchez-Hervás, M., Elizaquivel, P., Aznar, R., Ramón, D., 2009. Molecular characterization of the black *Aspergillus* isolates

Fig. 1. Phylogenetic tree of *Aspergillus* section *Nigri* population from Argentina based on the sequencing of β-tubulin, calmodulin, second largest subunit of RNA polymerase II and translation elongation factor 1α genes.

responsible for ochratoxin A contamination in grapes and wine in relation to taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri*. International Journal of Food Microbiology 132, 33–41.

Medina, A., Mateo, R., Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F.M., Jimenez, M., 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. Applied and Environmental Microbiology 71, 4696–4702.

Mogensen, J.M., Frisvad, J.C., Thrane, U., Nielsen, K.F., 2010. Production of fumonisin B_2 and B_4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 954–958.

Nielsen, K.F., Mogensen, J.M., Johansen, M., Larsen, T.O., Frisvad, J.C., 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Analytical and Bioanalytical Chemistry 395, 1225–1242.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2008. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 1727–1734.

O'Donnell, K., Kistler, C., Tacke, B.K., Casper, H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceeding of the Nationality Academy of Sciences 97, 7905–7910.

Oliveri, C., Torta, L., Catara, V., 2008. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. International Journal of Food Microbiology 127, 147–154.

Palencia, E.R., Klich, M.A., Glenn, A.E., Bacon, C.W., 2009. Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. Journal of Microbiological Methods 79, 1–7.

Pel, H.J.W., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., De Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nature Biotechnology 25, 221–231.

Perrone, G., Susca, A., Epifani, F., Mulè, G., 2006a. AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. International Journal of Food Microbiology 111, 22–27.

Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2006b. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. Applied and Environmental Microbiology 72, 680–685.

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Studies in Mycology 59, 53–66.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., Kocsubé, S., Toth, B., Kozakiewicz, Z., Samson, R.A., 2008. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* isolated from grapes in Europe. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 1032–1039.

Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2010. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. IMC9 The Biology of Fungi Congress. Edimburg, UK, P1.101. 6–10 August 2010.

Ponsone, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. International Journal of Food Microbiology 114, 131–135.

Saitou, N., Nei, N., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406–425.

Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology 50, 45–61.

Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J., 2007. Diagnostic tools to identify black Aspergilli. Studies in Mycology 59, 129–145.

Scientific Committee on Foods, European Commission, 2003. Updated opinion of the Scientific Committee on Foods on fumonisin B_1, B_2 and B_3. SCF/CS/CNTM/MYC/28 final. Directorate-scientific opinions. European Commission, Brussels.

Serra, R., Cabañes, F.J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mulè, G., Kozakiewics, Z., 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. Mycologia 98, 295–306.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. Food Additives and Contaminants 25, 193–202.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
BIBLIOTECA

U.A.N.L.
Biblioteca Central
71199

F4189