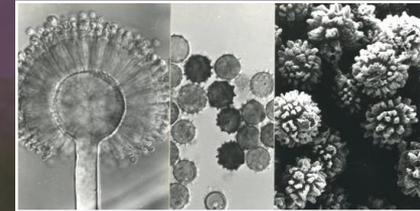


Departamento de Microbiología e Inmunología  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
Universidad Nacional de Río Cuarto



## Ecofisiología y genética de poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de uvas en Argentina.



Director: Chulze, Sofía Noemí.  
Codirector: Chiotta, María Laura.

Sosa, Débora María



# Introducción

## VID

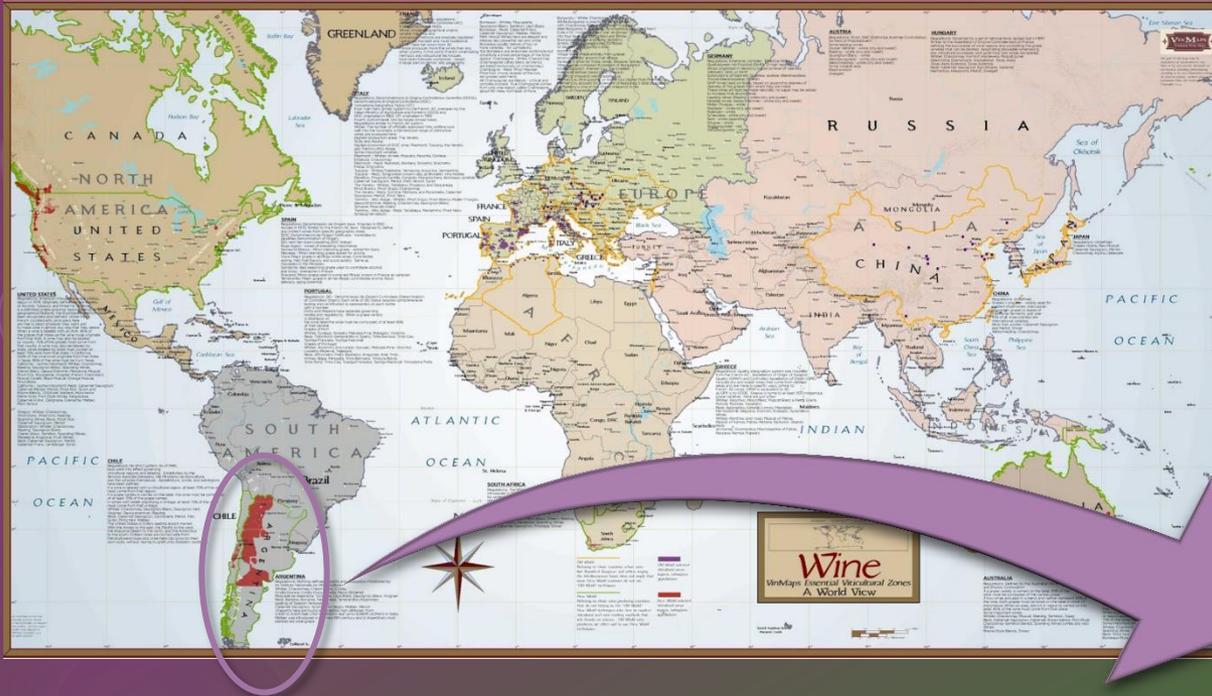
- ✓ Orden *Ramnales*
- ✓ Familia *Vitáceas*
- ✓ Género *Vitis*
- ✓ Especie *vinifera*.



- ✓ Cultivo frutal nativo de Asia Menor.
- ✓ Desarrolla preferentemente en clima templado.
- ✓ Consumo directo o fermentado.

# Introducción

## Vitivinicultura en Argentina



5° productor mundial.

7° en superficie cultivada.

8° consumidor mundial.

9° exportador de vinos.

228.585 hectáreas cultivadas.



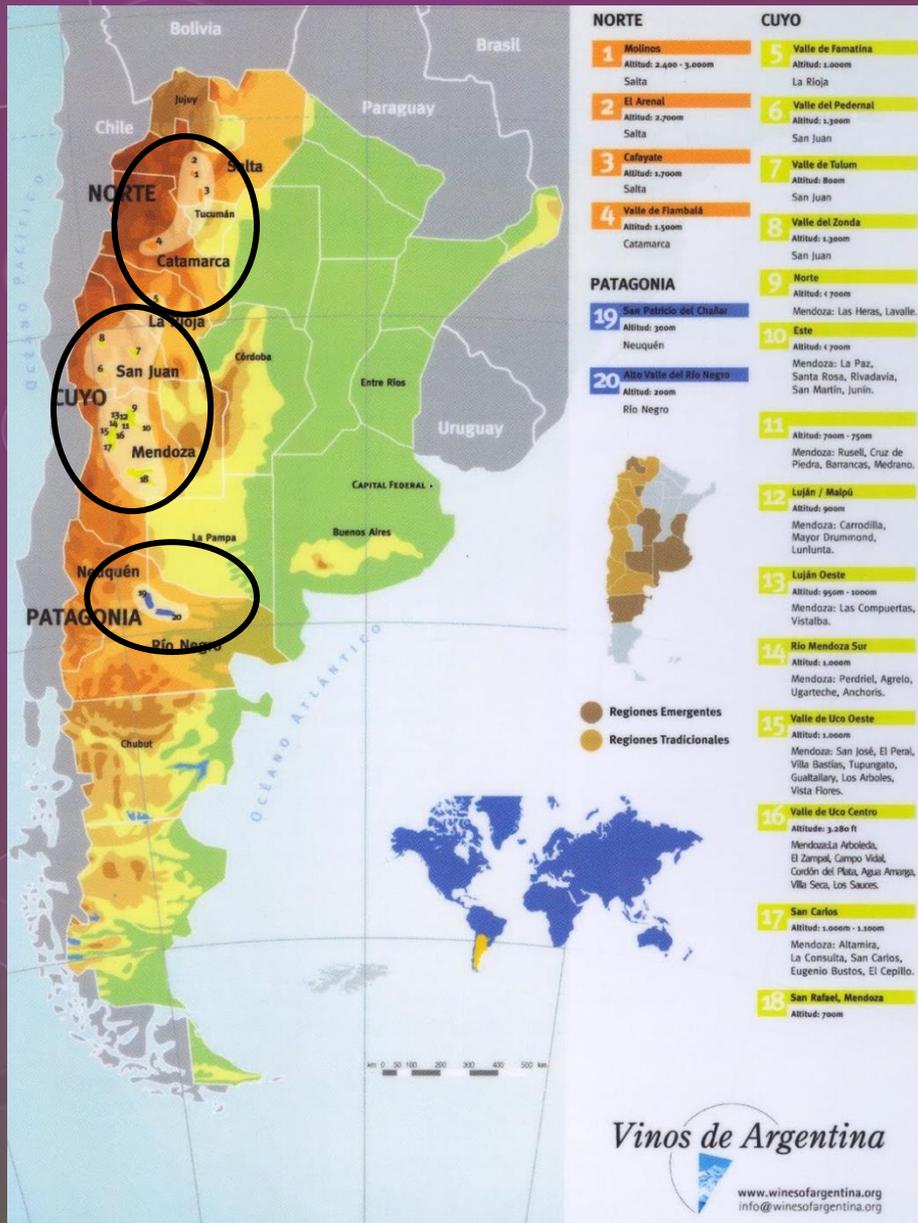
23 %

44 %

32 %



# Introducción



# Introducción

## PODREDUMBRE DEL RACIMO (*Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*)

PODREDUMBRE NEGRA  
EN UVAS

*Aspergillus*  
sección *Nigri*

Producción de  
OCRATOXINAS

Producción de  
FUMONISINAS

- ✓ Agregado *A. niger*
- ✓ *A. carbonarius*
- ✓ *A. aculeatus*
- ✓ *A. japonicus*



### Daño de bayas

- Enfermedades y plagas.
- Factores medioambientales.
- Diferencias varietales.



### Herida

- Zona blanda.
- Tostada-marrón.
- Masa pulverulenta.

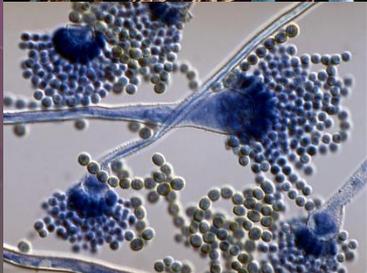


### Invasión

- Áreas coreáceas.
- Bayas vacías y secas.

# Introducción

## Género *Aspergillus*



Pier Antonio Micheli (1729)

Raper y Fennell (1965)

Gams y col. (1985)

Geiser y col. (2007)



- ✓ Phylum: *Ascomycota*
- ✓ Orden: *Eurotiales*
- ✓ Familia: *Trichocomaceae*
- ✓ Género: *Aspergillus*  
(*Eurotium*, *Emericella*)

Impacto económico

Positivo

- Industria de la fermentación.
- Biotransformación de químicos.

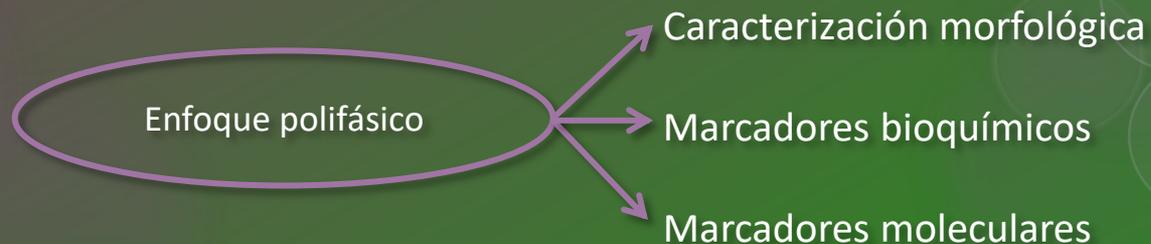
Negativo

- Alérgenos o patógenos animales y humanos.
- Deterioro de alimentos.

*Aspergillus niger*  
GRAS (FDA, 2012).

# Introducción

## *Aspergillus* sección *Nigri*



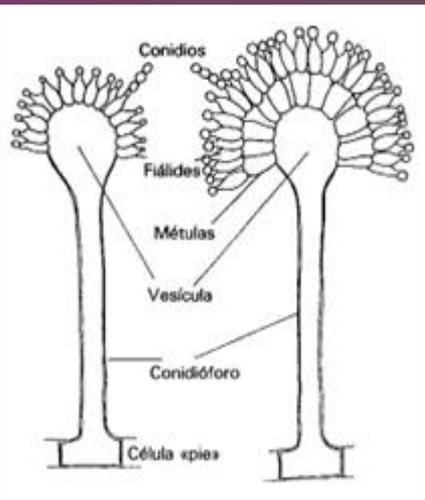
# Caracterización morfológica

## Características macroscópicas



- ✓ Color del micelio
- ✓ Exudados
- ✓ Pigmentos solubles
- ✓ Formación de esclerocios

## Características microscópicas



Cabeza conidial:

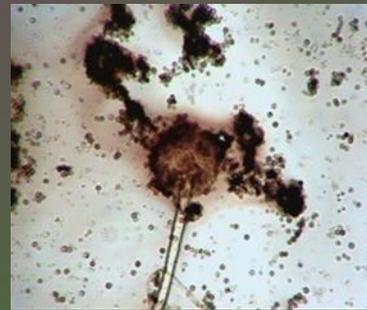
- ✓ Conidios
- ✓ Esterigmas

Conidióforos:

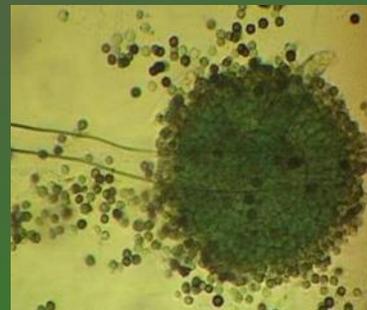
- ✓ Vesículas
- ✓ Estípites
- ✓ Célula pie

Hifas

Células de Hülle



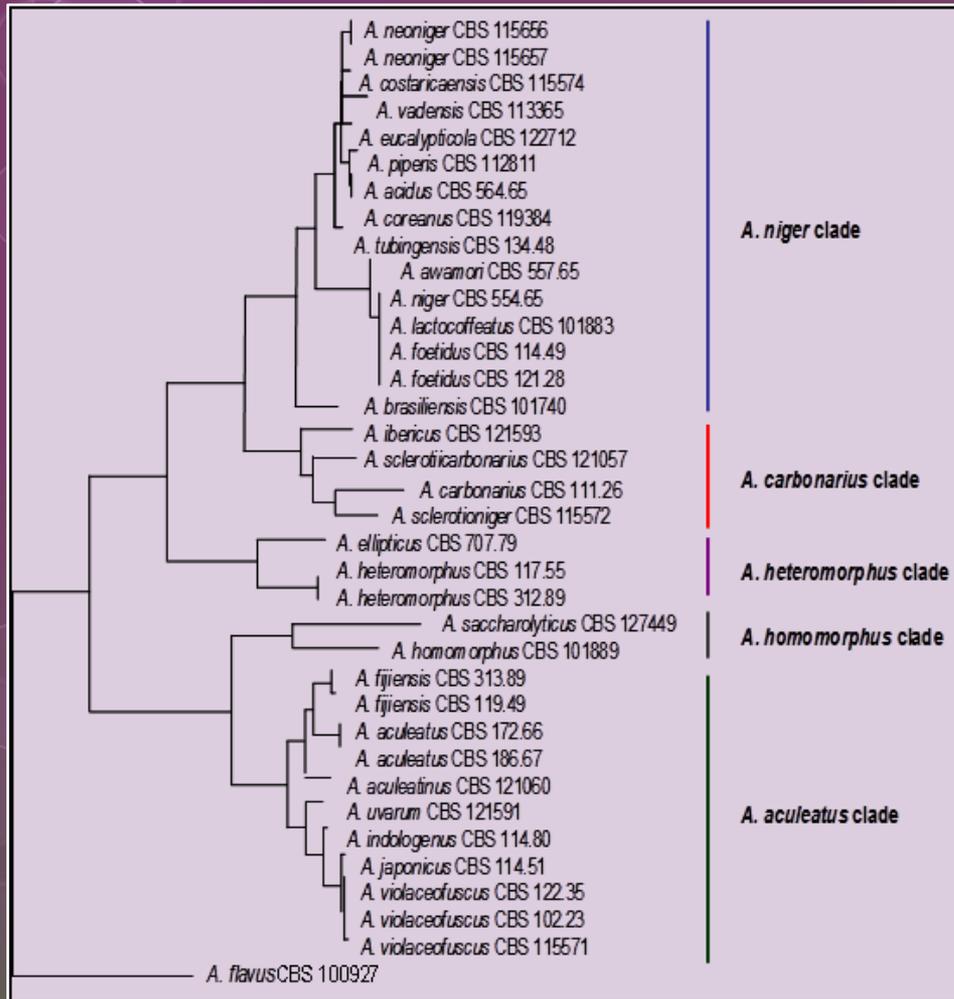
*Aspergillus agregado A. niger*



*Aspergillus carbonarius*

# Caracterización molecular

- ✓ Análisis de secuencia de los genes de  $\beta$  tubulina, calmodulina, factor de elongación  $1\alpha$ , subunidad de la ARN polimerasa II, de las regiones ITS, *tef1*,  $r$ RNA.
- ✓ Marcadores moleculares RFLP<sub>S</sub>, RAPD<sub>S</sub>, AFLP<sub>S</sub>.



## RFLP<sub>S</sub>

- Complejos patrones de ADN dirigidos con enzimas de restricción.
- Buena reproducibilidad.
- Laboriosos y difíciles de automatizar.

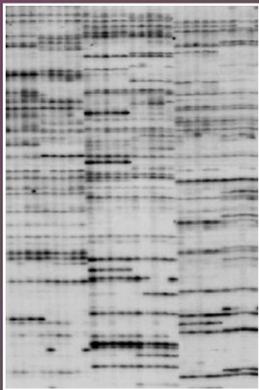
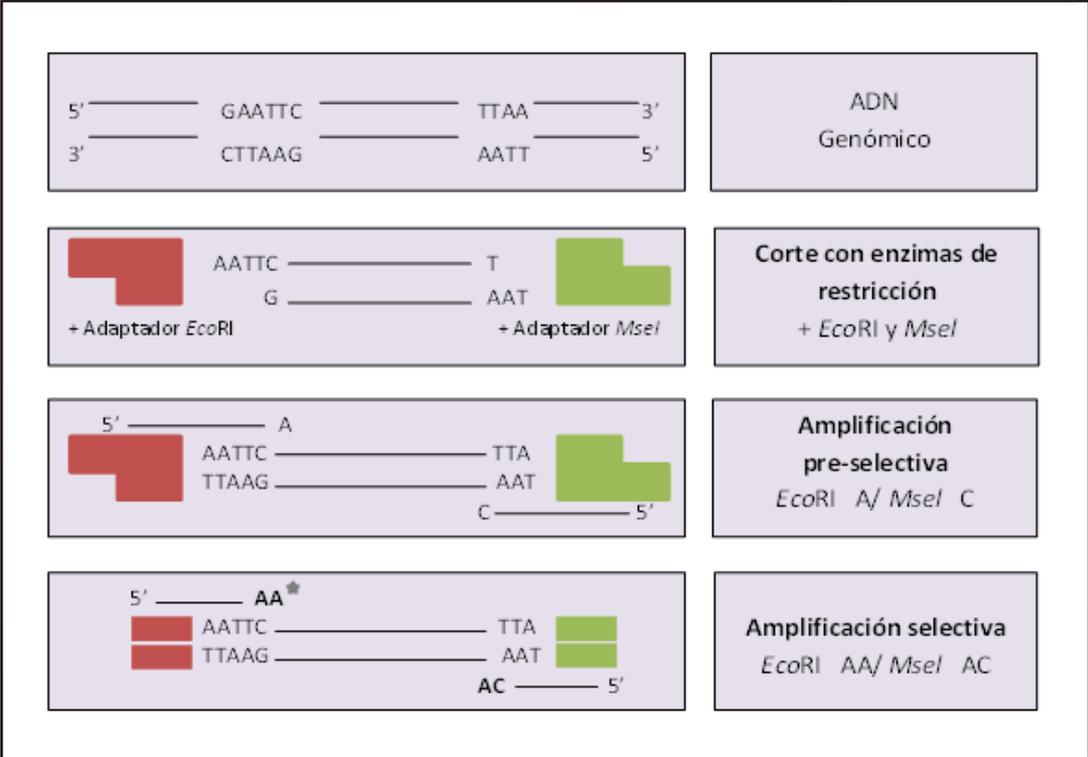
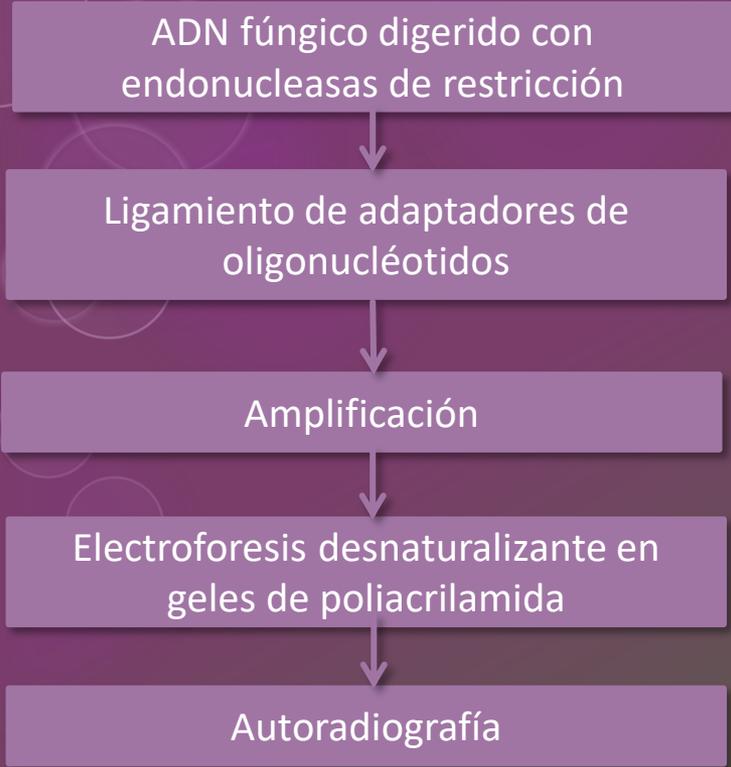
## RAPD<sub>S</sub>

- Fragmentos de ADN de longitud y secuencia indefinida
- Primers cortos y arbitrarios.
- Bajas temperaturas de apareamiento.
- Baja reproducibilidad.

## AFLP<sub>S</sub>

- Perfiles de marcadores complejos de ADN genómico sin conocer la secuencia .
- Amplificación selectiva de fragmentos de restricción.
- Altas temperaturas de apareamiento.
- Alta reproducibilidad y resolución.
- Robustez.
- Ilimitada posibilidad de generar polimorfismos.
- Fácilmente automatizables.

# Caracterización molecular: AFLP<sub>s</sub>

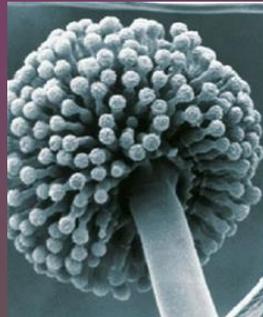


# Introducción

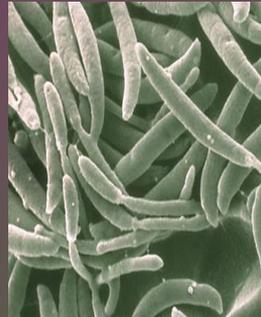
## Micotoxinas

Metabolitos fúngicos de bajo peso molecular, cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea, tiene efectos negativos, agudos y/o crónicos sobre la salud humana y animal.

Aflatoxinas



*Aspergillus*



*Fusarium*



*Penicillium*

Patulina

Ocratoxinas

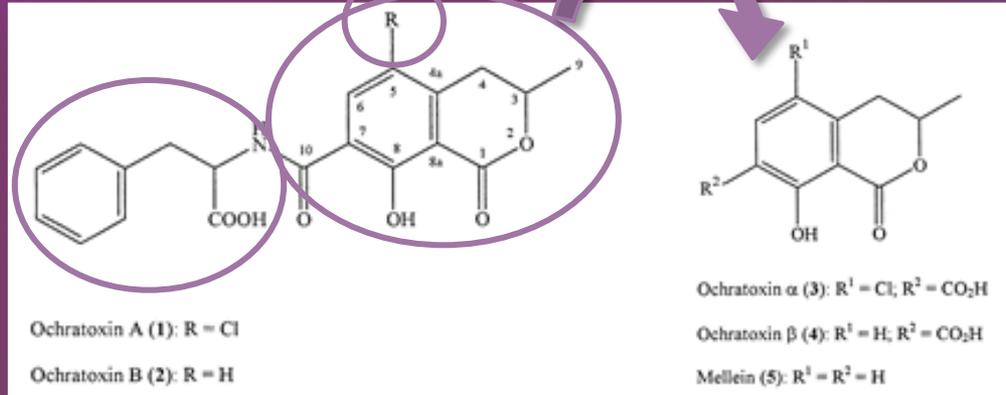
Zearalenona

Fumonisin

Tricotecenos

# Introducción

## Ocratoxinas



Termoestabilidad

- Nefrotóxica
- Hepatotóxica
- Neurotóxica
- Genotóxica
- Teratogénica
- Carcinogénica
- Inmunosupresora

Animales

Nefropatía porcina danesa  
Desordenes renales

Sensibilidad  
Ratón < Rata < Cerdo

Humanos

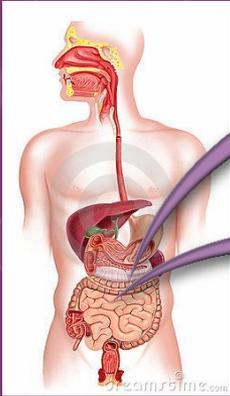
Nefropatía endémica de los Balcanes  
Nefropatía cariomegálica intersticial crónica  
Nefropatía intersticial crónica en Túnez

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado a esta toxina dentro del grupo 2B como posible carcinógeno para humanos.

# Introducción

## Ocratoxinas

### Toxicocinética



Excreción renal y hepatobiliar.

### Toxicodinámica

- ✓ Alteración de la respiración celular.
- ✓ Alteración de la síntesis de proteínas.
- ✓ Secuestro de calcio microsomal.

En base a los efectos tóxicos de la ocratoxina A la Comisión Europea (2006) ha establecido un límite admisible de contaminación con OTA de:

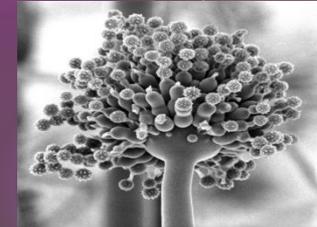
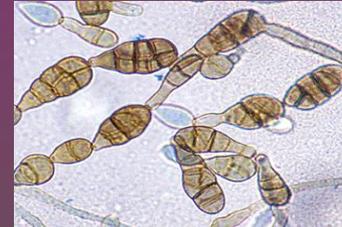
- 1-50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  en alimentos.
- 100-1000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  en piensos.

Vinos: 2  $\mu\text{g L}^{-1}$

# Introducción

## Fumonisin

1988



Producidas por *Fusarium*, *Alternaria* y cepas de *A. niger sensu stricto*.

Series

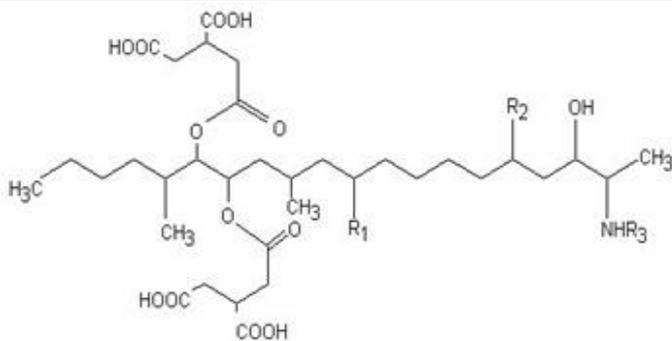
A

B

C

P

FB<sub>2</sub>, FB<sub>4</sub> y FB<sub>6</sub>



Fumonisin	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH3CO
A2	H	OH	CH3CO

Se asocia con cáncer de esófago y defectos del tubo neural en humanos. En animales produce leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar e hidrotórax en cerdos, toxicidad en ganado y aves de corral.

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado a la FB<sub>1</sub> dentro del grupo 2B como posible carcinógeno para humanos.

Máximo tolerable de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> en ingesta diaria:  
2 µg kg<sup>-1</sup> de peso corporal.

# Introducción

## Factores que afectan el desarrollo de *Aspergillus* y contaminación con OTA



- ✓ Suelos.
- ✓ Condiciones climáticas (aire, temperaturas, lluvias).
- ✓ Localización geográfica de los viñedos.
- ✓ Prácticas agrícolas.
- ✓ Daño por aves, insectos o infección con otras especies fúngicas.



Foco de podredumbre producido por *Botrytis cinerea*.



Podredumbre producida por *Uncinula necator*.



# Hipótesis y Objetivos

## Hipótesis

I- Las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* productoras de ocratoxina A que se aíslan frecuentemente en uvas en Argentina representan un riesgo toxicológico. Las interacciones entre las especies de la sección y los factores ambientales tales como, la temperatura y la actividad de agua influyen sobre el crecimiento de dichas especies y la subsecuente producción de OTA.

II- La contaminación de las uvas con especies pertenecientes al agregado *Aspergillus niger* productoras de fumonisinas representan un riesgo toxicológico en Argentina.

## Objetivo general

- ✓ Caracterizar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de uvas cosechados en diferentes regiones vitivinícolas de Argentina.

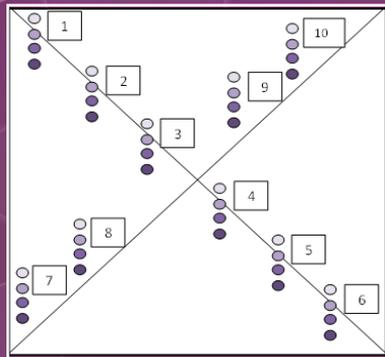
## Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la distribución de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas, en diferentes regiones vitivinícolas de Argentina.
- ✓ Corroborar la identificación morfológica clásica con la caracterización molecular a nivel de especie a través del uso de marcadores moleculares, AFLP<sub>5</sub>.
- ✓ Analizar la producción de ocratoxina A por parte de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de uvas, en medio de cultivo.
- ✓ Determinar la producción de fumonisinas de especies pertenecientes al agregado *A. niger*.



# Materiales y Métodos

## Micoflora (Porcentaje de Infección)



Muestreo del viñedo

- Merlot
- Malbec
- Cabernet Sauvignon
- Cabernet Franc
- Tempranillo
- Syrah
- Bonarda

50 bayas

Desinfección



Hipoclorito de sodio 1% (1 min.)

Agua destilada estéril



Medio DG18

Incubar 7 días 28°C

Pitt y Hocking (1997)  
Samson y col. (2000)

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ bayas infectadas}}{\text{N}^\circ \text{ bayas totales}} \times 100$$

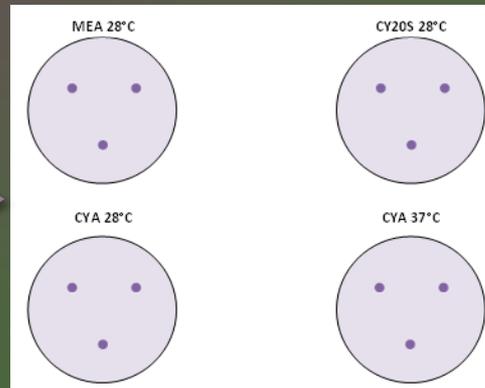


## Identificación de *Aspergillus* sección *Nigri*



MEA

Incubar 7 días 28°C



Incubar 7 días 28-37°C



Pitt y Hocking (1997)  
Klich (2002)

# Materiales y Métodos

## Capacidad toxigénica

### Producción de ocratoxina A (Bragulat y col., 2001)

213 cepas



CYA

Incubar 7 días 25°C



Metanol 1 ml



11000 rpm  
(20 min)



Filtración

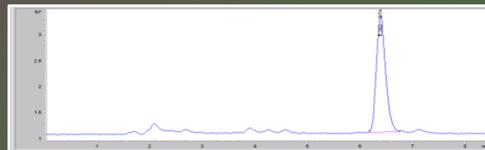
Conservar a 4°C



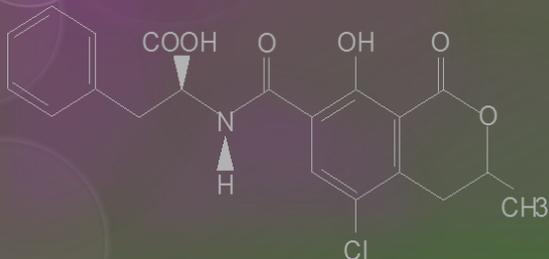
HPLC

Detección

Cuantificación

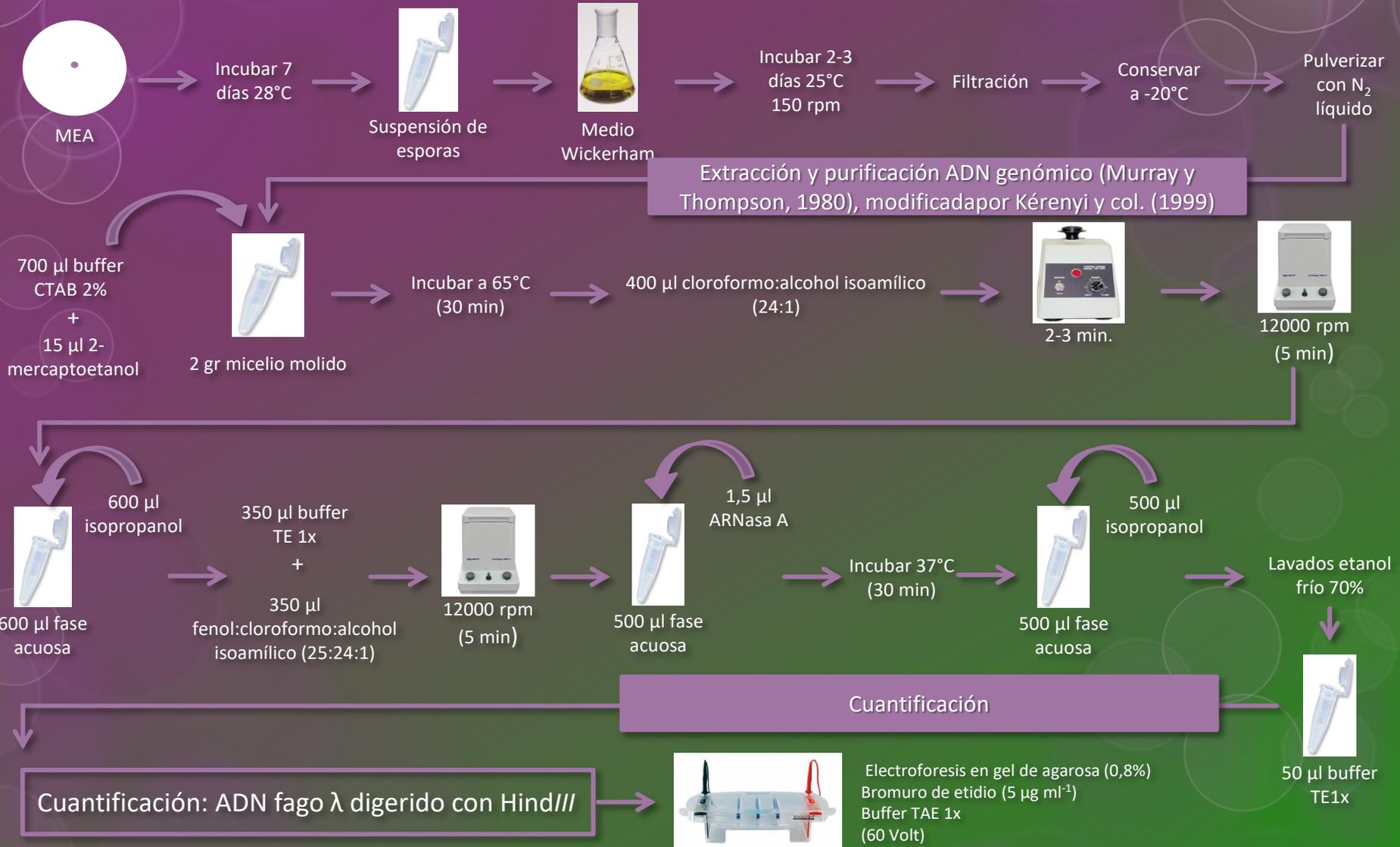


Columna de fase reversa C18  
Pre-columna Supelguard LC-ABZ  
Loop: 50 µL.  
Fase móvil: Acetonitrilo: agua: ácido acético  
Flujo FM: 1 ml min<sup>-1</sup>.  
λ excitación: 330 nm y λ emisión: 460 nm



# Materiales y Métodos

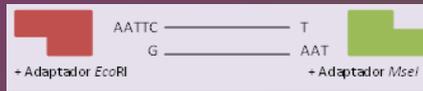
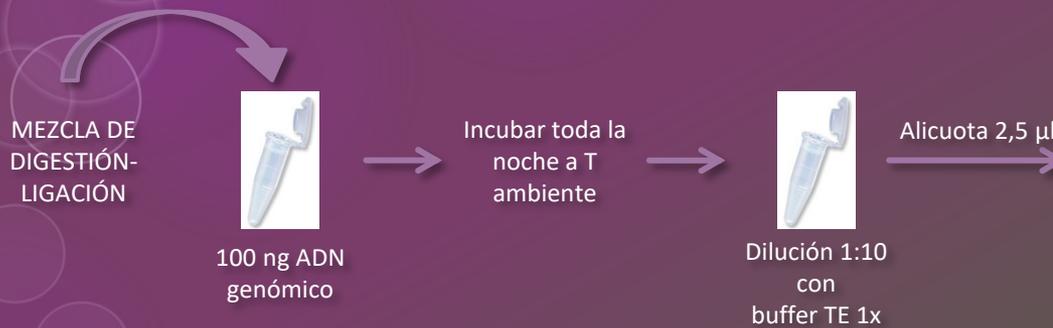
## Caracterización de las especies mediante AFLP<sub>s</sub>



# Materiales y Métodos

## Generación de marcadores AFLP<sub>s</sub>

### Digestión- Ligación



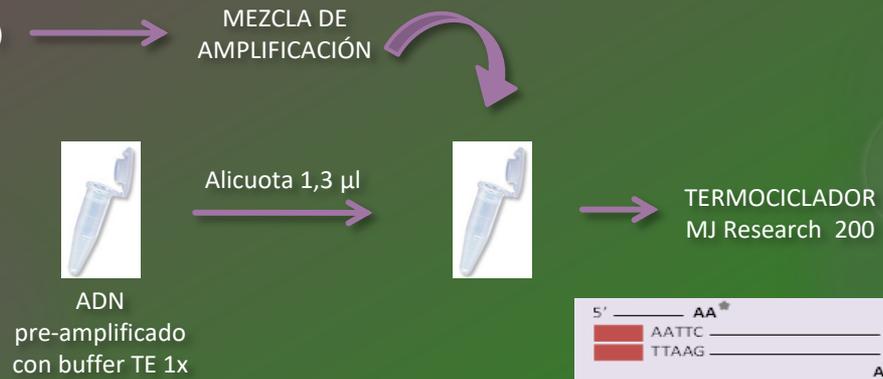
### Pre-amplificación



### Amplificación

Cebadores:

- *EcoRI* ([ $\gamma$ <sup>33</sup>P] ATP y T4 polinucleótido quinasa)
- *MseI*



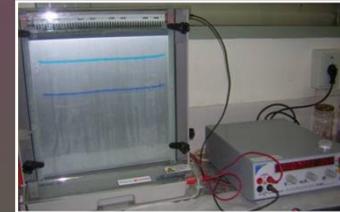
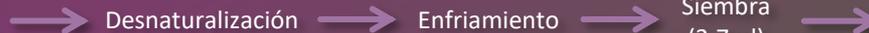
# Materiales y Métodos

## Generación de marcadores AFLP<sub>s</sub>

### Electroforesis



Dilución en formamida



Gel de poliacrilamida al 6%

Electroforesis en gel de poliacrilamida (6 %)  
Buffer TBE 1x  
60 Volt (2 horas)

Secado al vacío a 80°C (2 hs)



# Materiales y Métodos

## Capacidad toxigénica

### Producción de fumonisinas (Frisvad y col., 2007)

10 cepas *Aspergillus*  
agregado *A. niger*



CY20S

Incubar 7  
días 25°C



Metanol: agua  
(70:30)

Sonicar  
(50 min)



Filtración

Evaporación

Conservar a  
4°C

#### Detección y Cuantificación

Columna de fase reversa C18  
Pre-columna Supelguard LC-ABZ  
Loop: 50  $\mu$ L.  
Fase móvil: Metanol:Fosfato de sodio 0,1M  
Flujo FM: 1,5 ml min<sup>-1</sup>.  
 $\lambda$  excitación: 335 nm y  $\lambda$  emisión: 440 nm

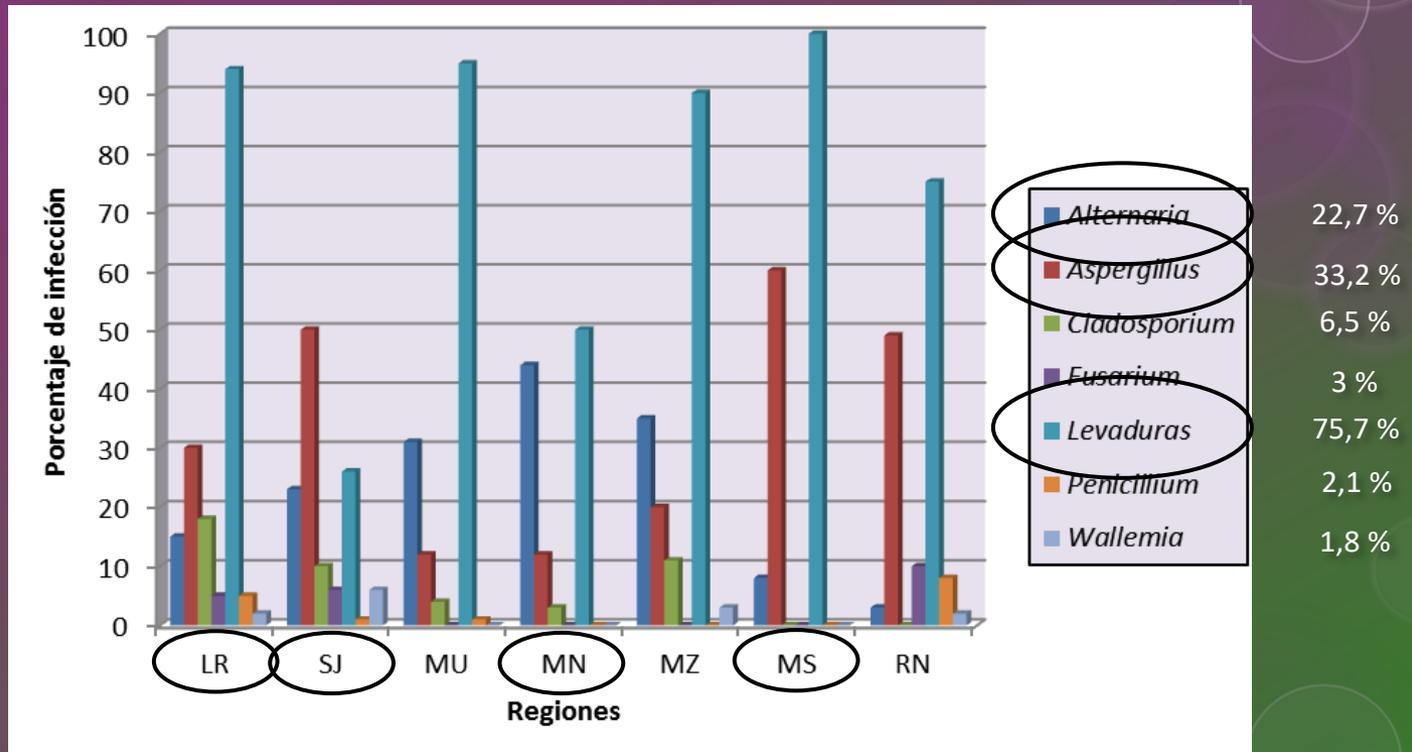


HPLC



# Resultados y Discusión

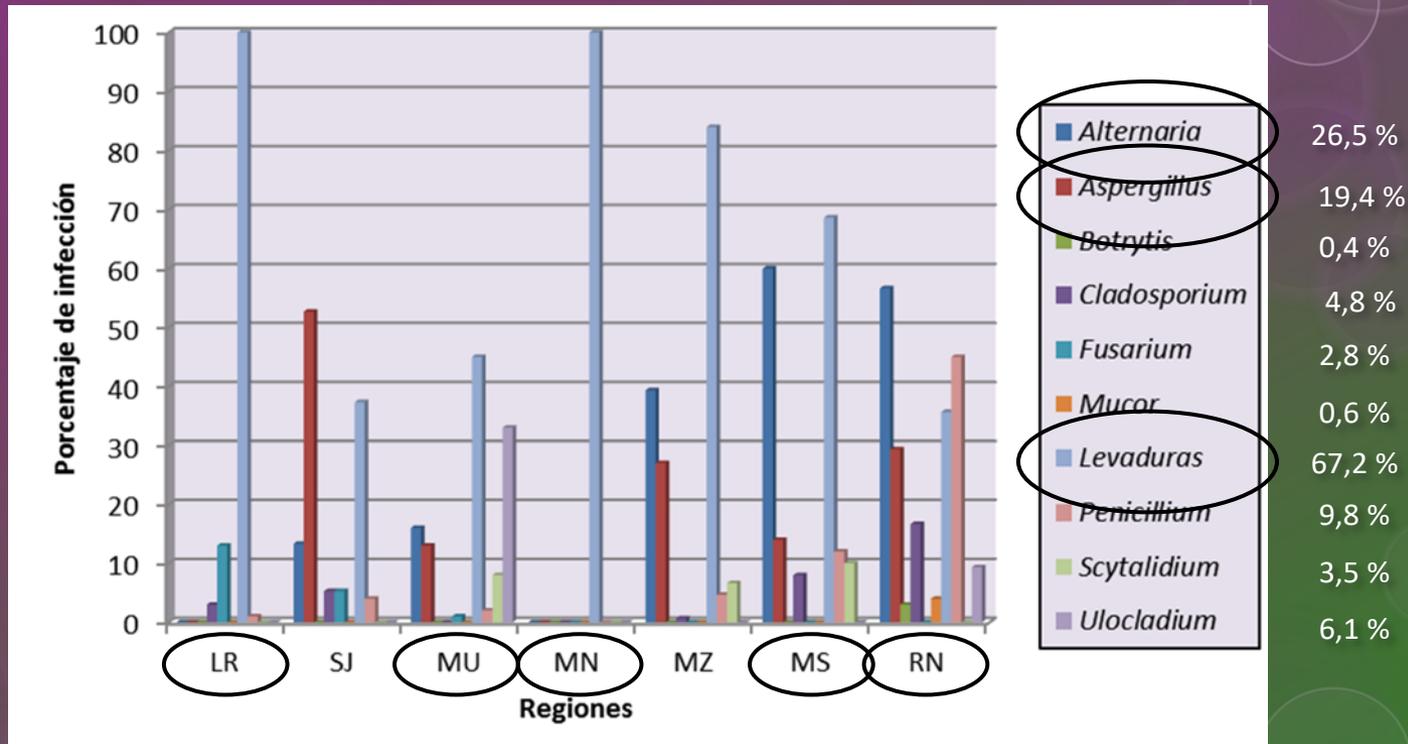
## Micoflora en uvas



Micoflora de la Vendimia 2009/2010

# Resultados y Discusión

## Micoflora en uvas

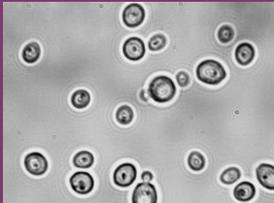


Micoflora de la Vendimia 2010/2011

# Resultados y Discusión

## Micoflora en uvas

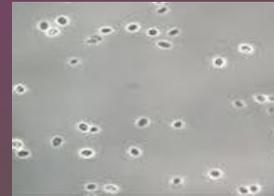
### Levaduras



*Kluyveromyces thermotolerans*  
(Ponsone y col., 2011).



### Potenciales agentes biocontroladores



*Cryptococcus laurentii* – *Aureobasidium pullulans*  
(Bleve y col., 2006).



### Hongos filamentosos



✓ Alternariol y alternatiol monometil éter (vinos tintos) (Scott y col., 2006).



✓ Ocratoxina A en uvas y vinos.

- ✓ Argentina.
- ✓ Brasil.
- ✓ Francia.
- ✓ España.

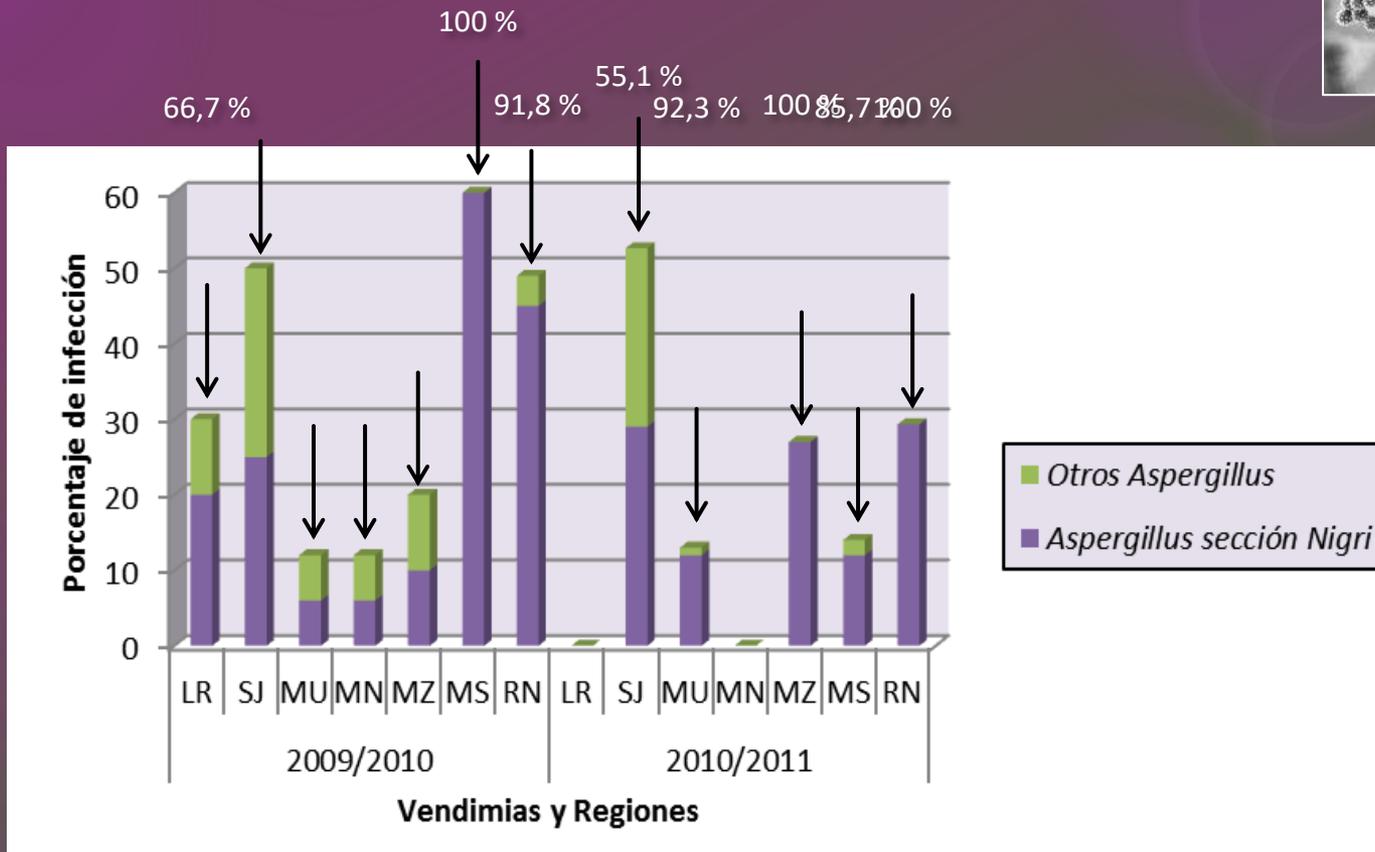
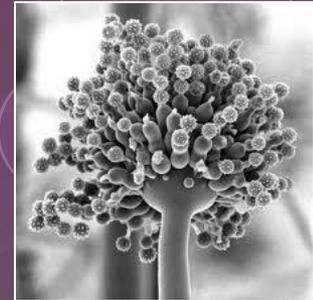
# Resultados y Discusión

*Aspergillus* sección *Nigri*



73,8 %

80,4 %



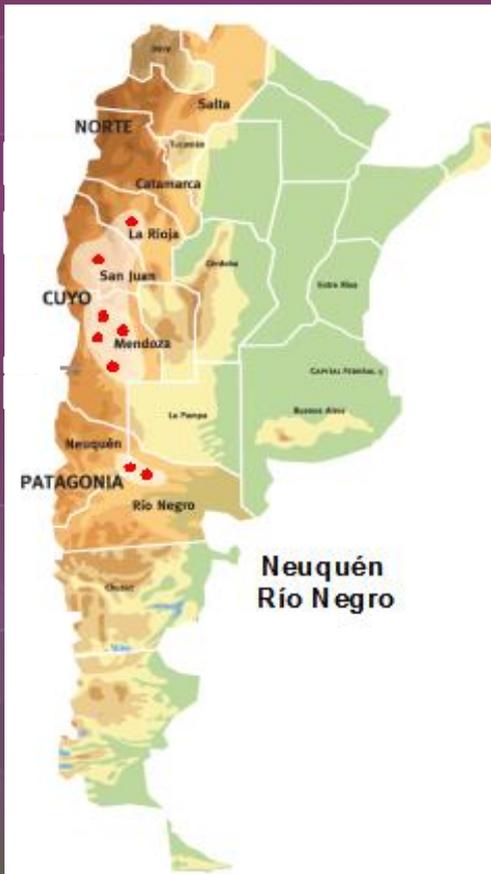
Micoflora de la Vendimia 2010/2011

# Resultados y Discusión

## *Aspergillus* sección *Nigri*

Incidencia variable

- ✓ Estados fenológicos.
- ✓ Condiciones climáticas.
- ✓ Localización geográfica de los viñedos.
- ✓ Factores bióticos.
- ✓ Factores externos.



La Rioja

- Clima semi-árido.
- Precipitaciones.
- Levaduras.

San Juan

- Clima semi-árido.

Mendoza

- Clima cálido.
- Levaduras.
- Tormentas y granizo.
- Vientos.
- Prácticas de manejo.
- Daño por insectos.

Neuquén-Río Negro

- Clima marítimo.

# Resultados y Discusión

## Identificación morfológica

*Aspergillus*  
uniseriados

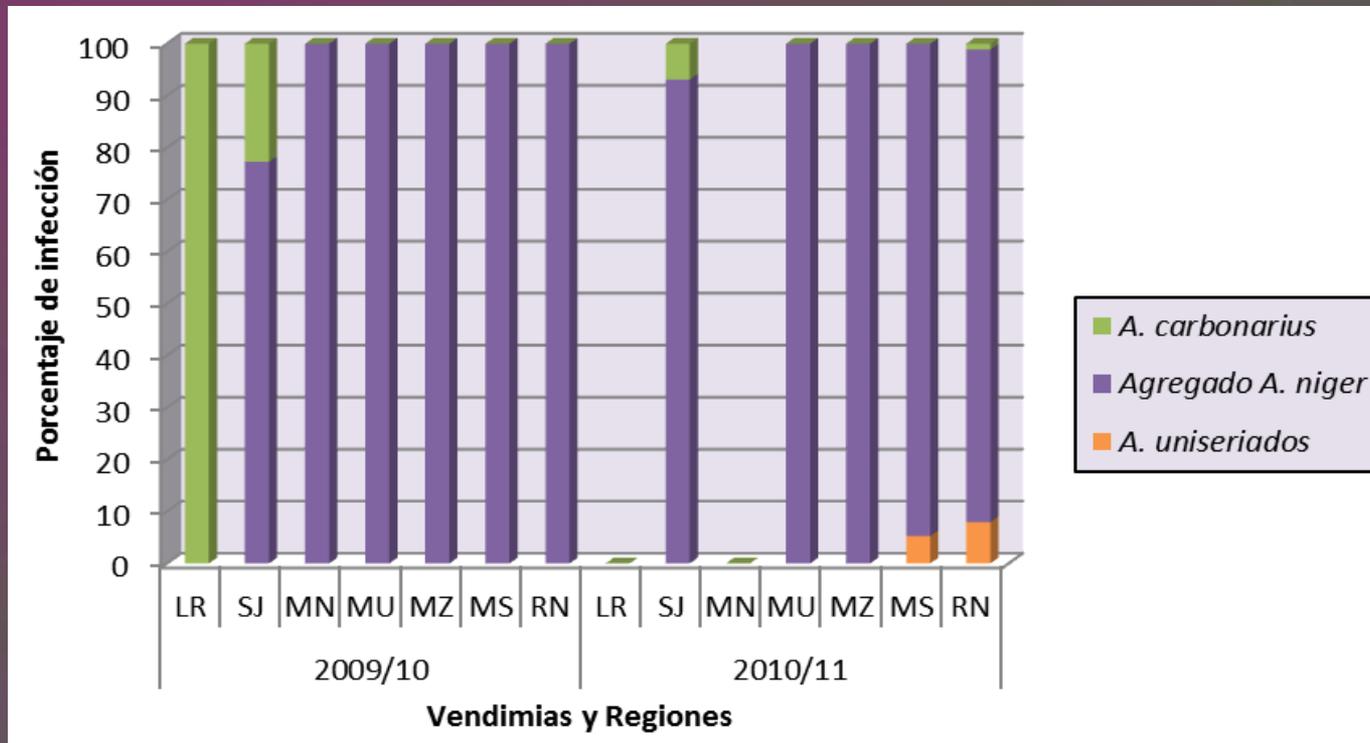


Vendimia  
2009/2010

Vendimia  
2010/2011

87,5 %

95,6 %



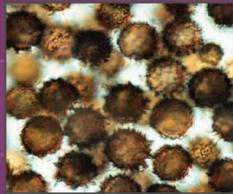
Especies de *Aspergillus* sección *Nigri*

# Resultados y Discusión



*Aspergillus*  
agregado *A. niger*

- ✓ Rápida velocidad de crecimiento.
- ✓ Tolerancia a amplio rango de temperaturas.



*Aspergillus*  
*carbonarius*

- ✓ Temperaturas mas elevadas.
- ✓ Correlación negativa con las precipitaciones.



*Aspergillus*  
uniseriados

- ✓ Bajos porcentajes de aislamiento.
- ✓ Son mas frecuentes en la región mediterránea, como Francia, Italia e Israel.
- ✓ Presentes en estadios tempranos de maduración.



*Cabernet Sauvignon*



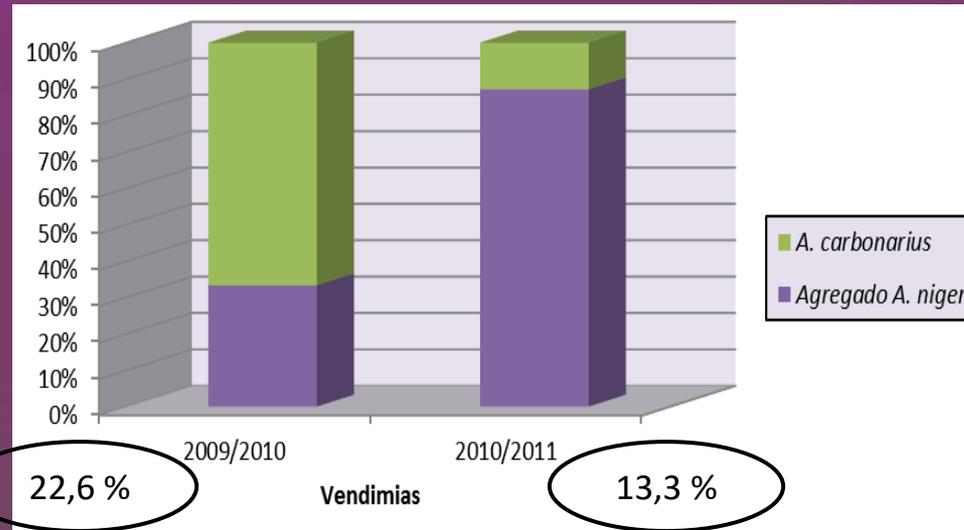
*Syrah*



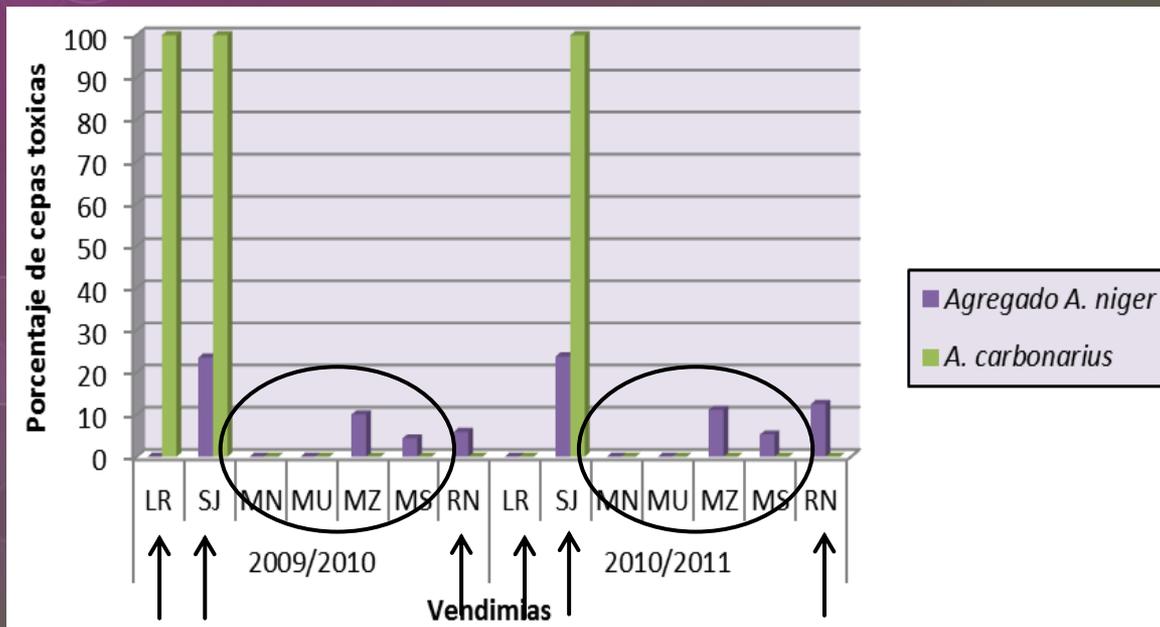
*Malbec*

# Resultados y Discusión

## Capacidad toxigénica



Porcentaje de cepas ocratoxigénicas de *Aspergillus carbonarius* y del agregado *A. niger*, durante ambas vendimias.



Cepas productoras de ocratoxina A en las diferentes zonas analizadas.

# Resultados y Discusión

## Capacidad toxigénica

Regiones	Vendimia 2009/2010 (ng g <sup>-1</sup> )		Vendimia 2010/2011 (ng g <sup>-1</sup> )	
	Rango	Media	Rango	Media
LR	0	0	0	0
	4,7-425,7	243,6	0	0
SJ	9,9-86,3	41,5	0,01-5,16	1,23
	16,8-113,4	72	1294,96-2358,92	1826,94
MN	0	0	0	0
	0	0	0	0
MU	0	0	0	0
	0	0	0	0
MZ	61	61	0,01	0,01
	0	0	0	0
MS	7,4	7,4	0,01	0,01
	0	0	0	0
RN	13,5	13,5	0,01-4,28	0,72
	0	0	0	0

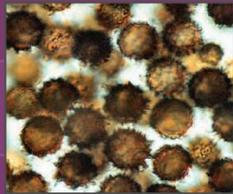
Niveles de producción de ocratoxina A producidos por cepas pertenecientes al agregado *A. niger* y *A. carbonarius* aisladas de uvas.

# Resultados y Discusión



*Aspergillus*  
agregado *A. niger*

✓ Mayor número de especies productoras de OTA.



*Aspergillus*  
*carbonarius*

✓ Principal productor de OTA en uvas.  
✓ Poder de invasión de bayas.



*Aspergillus*  
uniseriados

✓ Sin relevancia.

Patrón de producción  
similar en:

- Argentina.
- Brasil.
- Australia.
- Mediterráneo.

# Resultados y Discusión

## Identificación molecular

58 cepas

*EcoRI* + AC / *MseI* + CC

*EcoRI* + AC / *MseI* + CA

*EcoRI* + G / *MseI* + CT

*EcoRI* + AT // *MseI* + CG

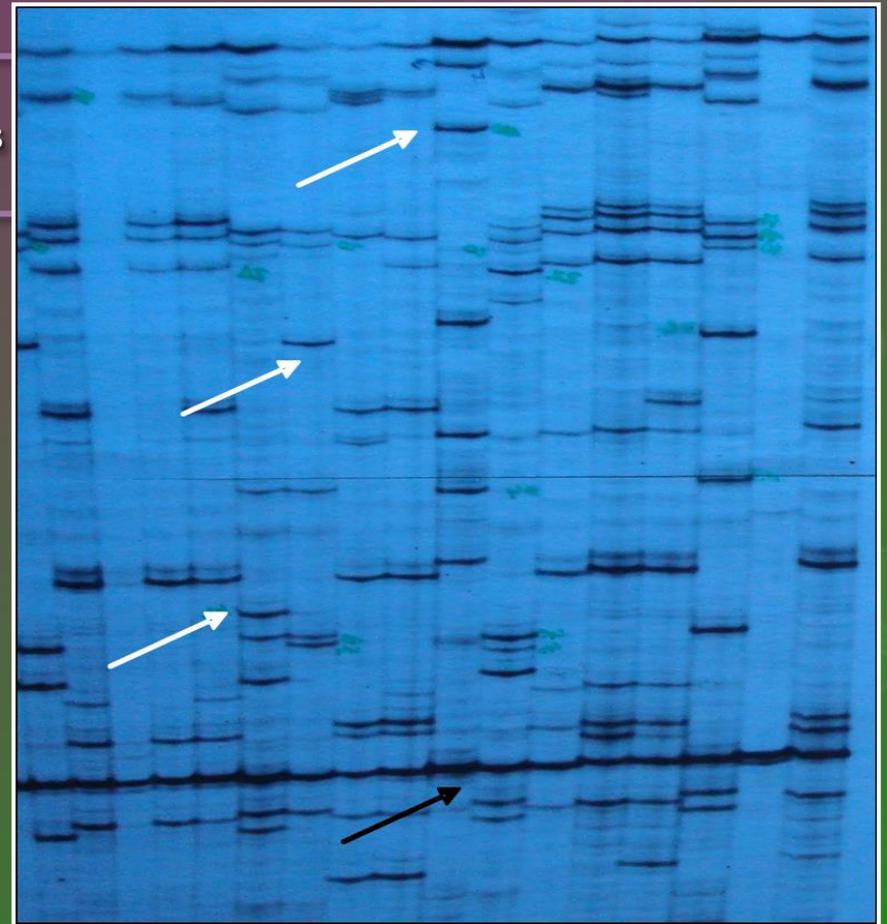
*EcoRI* + TG / *MseI* + CG

Bandas específicas de género

Bandas monomórficas

Bandas polimórficas

Escaso número de bandas



Gel de poliacrilamida obtenido de la combinación TG/CG.

# Resultados y Discusión

## Identificación molecular

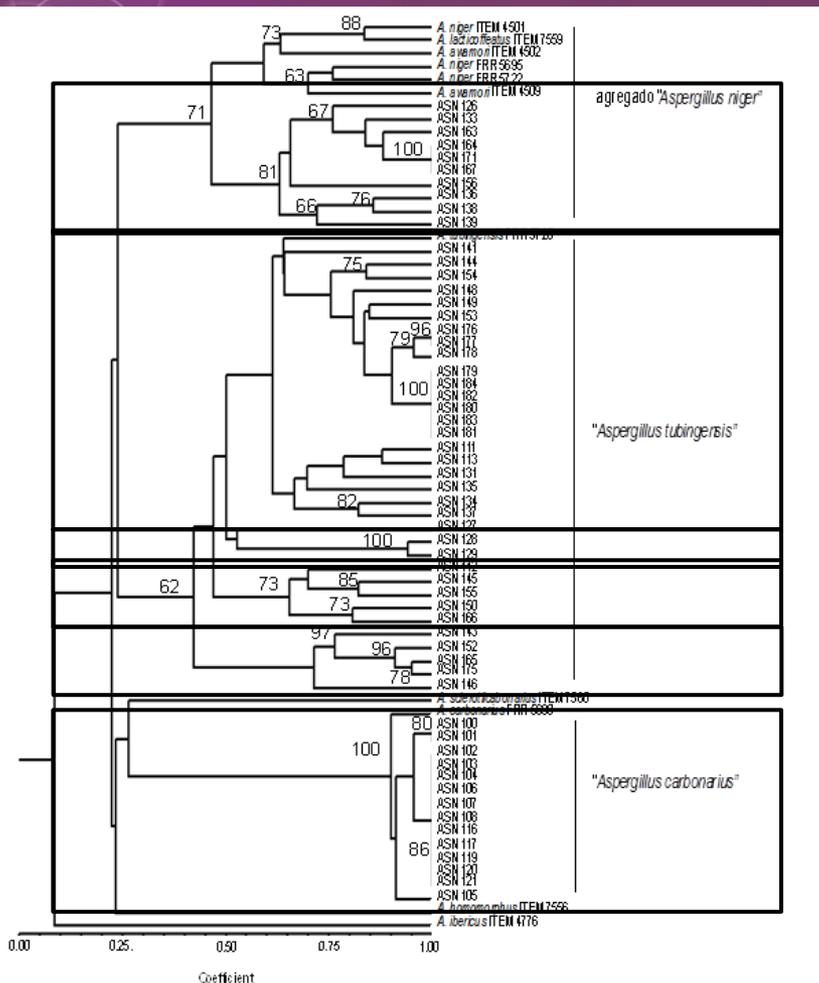
107 Bandas

Matriz Binaria

Dendrograma

Comparación entre haplotipos

Separación en clados



- ✓ Agregado *A. niger*
  - 48 % similitud.
  - OTA (+): 1 %
- ✓ *A. tubingensis*
  - 59 % similitud. (53-71 %)
  - OTA (+): 17,64 %
- ✓ *A. carbonarius*
  - 90 % similitud .
  - OTA (+): 100 %

Dendrograma obtenido por AFLP. Los números sobre las ramas indican el porcentaje de réplica en los cuales los taxones asociados se agrupan juntos (bootstrap= 1000 réplicas).

# Resultados y Discusión

## Producción de fumonisinas

✓ No se detectaron cepas de *Aspergillus* agregado *A. niger*, productoras de fumonisinas.

FB<sub>2</sub> y FB<sub>4</sub>

Frisvad y col. (2007b), Logrieco y col. (2009) y Mogensen y col. (2010), Chiotta y col. (2011).

- *A. uvarum*
- *A. tubingensis*
- *A. carbonarius*
- *A. acidus*

No productores

FB<sub>6</sub>  
(Mansson y col., 2010)



Isómero posicional de FB<sub>1</sub> e iso-FB<sub>1</sub>

# Objetivos

---

## Objetivo general

- ✓ Evaluar la influencia de factores abióticos sobre el crecimiento de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y la producción de ocratoxina A.

## Objetivo específico

- ✓ Determinar los efectos de las interacciones de la actividad acuosa y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de OTA en medio de cultivo por especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de uvas, analizadas individualmente, o en interacción.

# Materiales y Métodos

## Ensayo de ecofisiología

*Aspergillus tubingensis*

*Aspergillus carbonarius*



SGM

Incubar 7 días 25°C

1000  $\mu$ l  
Suspensión  $10^6$   
esporas  $\text{ml}^{-1}$



Medio SGM



Glicerol  
( $a_w$  0,92; 0,95;  
0,965; 0,98)

*Aspergillus tubingensis*



5  $\mu$ l

*Aspergillus carbonarius*



5  $\mu$ l

Co-inoculación



5  $\mu$ l

Mezclar 500  $\mu$ l  
de cada  
suspensión

$T \backslash a_w$	0,92	0,95	0,965	0,98
20°C	X3	X3	X3	X3
28°C	X3	X3	X3	X3
35°C	X3	X3	X3	X3

## Capacidad toxigénica

Bragulat y col. (2001)

## Análisis estadístico

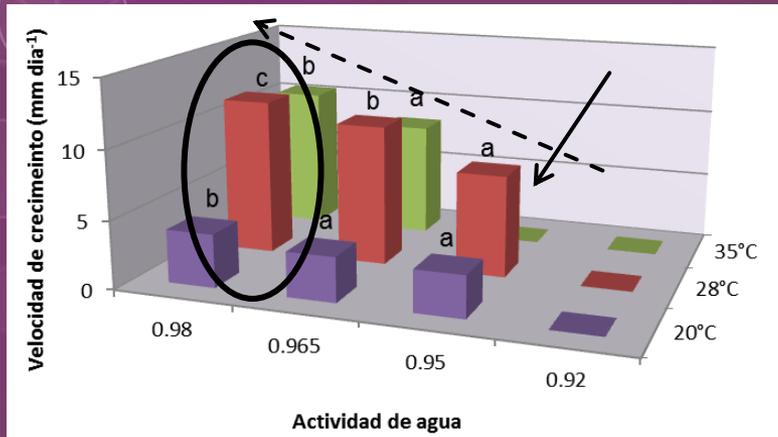
- ✓ ANOVA
- ✓ Test de Tukey (HSD)
- ✓ Test de Fisher (LSD)
- ✓ Test de Kruskal-Wallis (no paramétrico)

# Resultados y Discusión

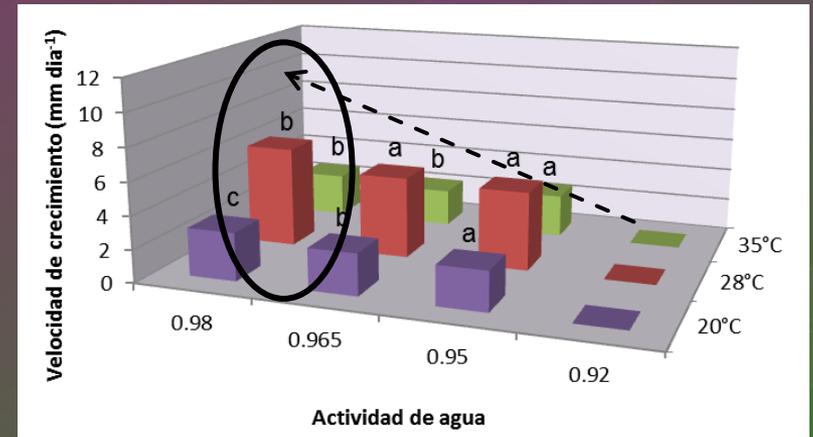
Ecofisiología

Efecto de la temperatura y  $a_w$  sobre el crecimiento de *Aspergillus* sección *Nigri*

*A. tubingensis*



*A. carbonarius*



Efectos de la temperatura y  $a_w$  sobre la velocidad de crecimiento sobre un medio de jugo de uvas sintético (SGM).

7,4 – 11,5 mm día<sup>-1</sup>

> Tasa de crecimiento

4,8 – 6,1 mm día<sup>-1</sup>

3 – 3,9 mm día<sup>-1</sup>

< Tasa de crecimiento

2,2 – 2,6 mm día<sup>-1</sup>

# Resultados y Discusión

## Condiciones de crecimiento óptimas

Resultados europeos y australianos:  
Mitchell y col. (2003, 2004); Bellí y col.  
(2004); Battilani y col. (2006); Leong y  
col. (2006).

*A. niger*: 35°C – 0,98 a<sub>w</sub>

*A. carbonarius*: 30°C – 0,965 a<sub>w</sub>

En Argentina,  
Romero y col. (2006)

Tasa máxima de crecimiento  
Leong y col. (2006).

*A. niger*: 11,3 mm día<sup>-1</sup>

*A. carbonarius*: 7 mm día<sup>-1</sup>

*A. carbonarius*:  
17,5 mm día<sup>-1</sup>  
(30°C – 0,95 a<sub>w</sub>)

Mayor tasa de crecimiento

Mayor tolerancia a un amplio  
rango de temperaturas y a<sub>w</sub>

*A. tubingensis*

# Resultados y Discusión

## Ecofisiología

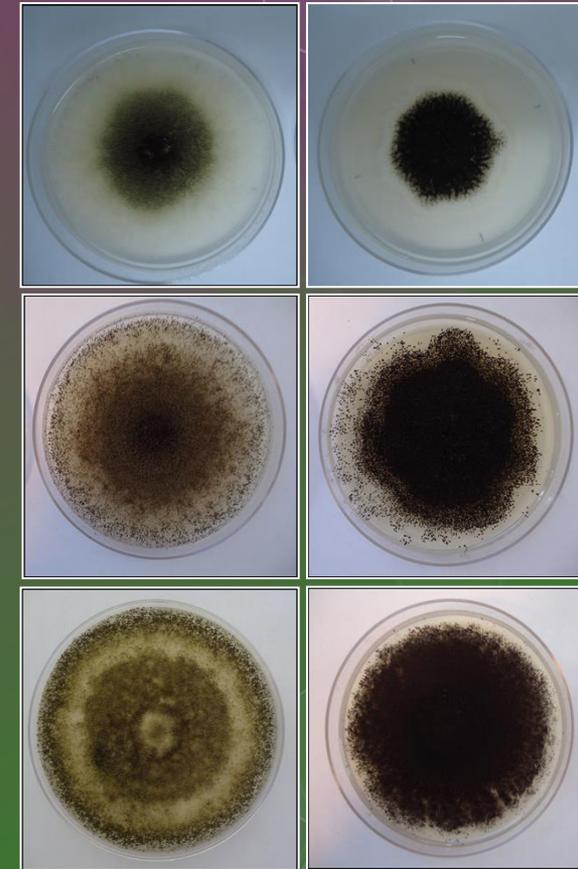
## Efecto de la temperatura y $a_w$ sobre la fase de latencia de *Aspergillus* sección *Nigri*

Cepa	$a_w$	20°C	28°C	35°C
		Fase Lag $\pm$ SD	Fase Lag $\pm$ SD	Fase Lag $\pm$ SD
<i>A. tubingensis</i>	0.920	>504	>504	>504
	0.950	32,7 $\pm$ 0,4 a	12,7 $\pm$ 0,2 a	>504
	0.965	28,7 $\pm$ 0,4 b	11,5 $\pm$ 0,1 b	13,8 $\pm$ 0,7 a
	0.980	27,8 $\pm$ 0,4 c	10,2 $\pm$ 0,1 c	10,0 $\pm$ 0,1 b
<i>A. carbonarius</i>	0.920	>504	>504	>504
	0.950	46,0 $\pm$ 1,2 a	24,6 $\pm$ 0,2 a	43,8 $\pm$ 0,9 a
	0.965	44,3 $\pm$ 0,8 a	23,5 $\pm$ 0,6 b	48,0 $\pm$ 1,5 b
	0.980	40,1 $\pm$ 1,0 b	18,5 $\pm$ 0,3 c	40,4 $\pm$ 0,3 c

Fase de latencia (hs) de *A. tubingensis* y *A. carbonarius* en SGM bajo diferentes condiciones medioambientales.

### *A. carbonarius*

- A 35°C < 24 hs (Mitchell y col., 2004)
- A 35°C: 6 hs (Romero y col., 2007).



Crecimiento de *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus carbonarius* a 28°C y 0,98  $a_w$  a los 7, 14 y 21 días, en medio SGM.

# Resultados y Discusión

## Ecofisiología

### Efecto de la temperatura, $a_w$ e interacción entre las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, sobre la producción de ocratoxina A

Cepa	$a_w$	20°C			28°C			35°C		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14d	21 d	7 d	14 d	21 d
<i>A. tubingensis</i>	0,95	0,15 ab	8,23 ab	5,9 ab	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0,965	1,93 a	6,3 a	5,1 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0,98	0,11 b	16,6 b	17 b	ND	ND	0,5	ND	ND	ND
<i>A. carbonarius</i>	0,95	18,7 a	571 a	292,2 a	ND	ND	ND	14,7 ab	0,14 a	29,6 ab
	0,965	24,2 ab	446,3 ab	176,7 ab	ND	ND	ND	10,9 a	0,43 ab	21,7 a
	0,98	63,7 b	77,4 b	53,9 b	ND	0,5	3,1	25,36 b	57,4 b	38,2 b
Interacción	0,95	17,2 ab	663,5 a	244 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0,965	14,7 a	577,8 ab	161 b	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0,98	96,3 b	102,4 a	192,5 ab	ND	1,0	5,05	ND	ND	ND

Niveles de OTA (ng g<sup>-1</sup>) producido bajo la influencia de diferentes condiciones de temperatura y actividad de agua.

Umbral de acumulación (14 días)

# Resultados y Discusión

## Fase de latencia

Fases de latencia mas prolongadas

> Producción de OTA (a menor temperatura y  $a_w$ )

Mitchell y col. (2004), Bellí y col. (2004), Esteban y col. (2004)

## Temperatura

> Producción de OTA a 20°C

Concuerda:

- Bellí y col. (2004).
- Battilani y col. (2004).

Difiere:

- Mitchell y col. (2003)

$a_w$

> Producción de OTA a baja  $a_w$

Concuerda:

- Mitchell y col. (2004).
- Bellí y col. (2004, 2005).
- Leong y col. (2006).
- Hocking y col. (2007).
- Battilani y col. (2003).
- Esteban y .col. (2006)

0,98  $a_w$

Envero

0,95  $a_w$

Cosecha

# Resultados y Discusión

## Interacción (Valero y col., 2007)

*A. carbonarius*-OTA positivo/ *Aspergillus* agregado  
*A. niger*-OTA positivo



Baja producción de OTA

*A. carbonarius*-OTA positivo/ *Aspergillus* agregado  
*A. niger*-OTA negativo



Significativa disminución de  
la producción de OTA

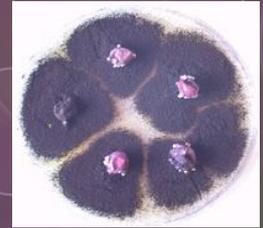
Competencia intraespecífica

- Limitación del crecimiento de la cepa productora.
- Utilización de los nutrientes específicos de la síntesis de OTA.
- Degradación por el competidos fúngico.

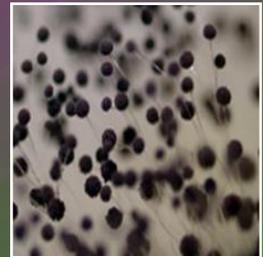


# Conclusiones

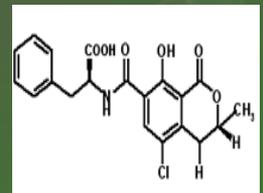
✓ Los principales géneros fúngicos que predominan como constituyentes de la micoflora sobre las bayas de uvas cosechadas en las diferentes regiones vitivinícolas de Argentina, son *Alternaria* y *Aspergillus*, los cuales poseen además un potencial riesgo toxicológico asociado.



✓ La biodiversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* estuvo representada por especies pertenecientes al agregado *A. niger* como predominantes, seguidas por *A. carbonarius* y *Aspergillus* uniseriados. Mediante el uso de marcadores moleculares generados por AFLP<sub>s</sub> se identificaron tres grupos dentro de la sección *Nigri*: *A. carbonarius*, agregado *A. niger* y *A. tubingensis*.



✓ La micoflora toxigénica estuvo representada por *A. carbonarius* y especies del agregado *A. niger*, siendo *A. carbonarius* el principal productor de ocratoxina. Las especies del agregado *A. niger* produjeron ocratoxina, pero no fumonisinas.



✓ Las condiciones de crecimiento óptimo para *A. tubingensis* y *A. carbonarius* fueron similares, sin embargo *A. tubingensis* mostró un crecimiento más rápido que *A. carbonarius*. La producción de OTA fue óptima a 20°C y a los 14 días. *A. carbonarius* tanto solo como en condiciones de interacción, produce los mayores niveles de toxina.





**Muchas gracias por su  
atención.**