

GIAJ MERLERA, GUILLE

Diversidad de especi

73978

2014

73978



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

**Diversidad de especies de *Aspergillus*
sección *Nigri* aisladas de diferentes
productos de interés agrícola**

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Microbiólogo Gaj Merlera Guillermo

Diciembre 2014

73978

MFN:
Classif:
T.945

Agradecimientos;

- A mi familia por su apoyo incondicional, su confianza, su sabiduría, sus consejos en todo momento.

- A mis directoras, Dra. Reynoso María Marta y Dra. Torres Adriana, por ser la guía durante este desarrollo, por la oportunidad, por compartir sus conocimientos y sus días. También estoy muy agradecido por la confianza brindada. Gracias!!

- A los miembros del jurado, por aceptar ser parte de este trabajo, por sus correcciones y aportes.

- A mis compañeros de Laboratorio (Emanuel Fantini, Mauricio Ganuza, Carla Barberis, Verónica Fumero, Julia Nichea, Nadia Yerkovich, Sofia Palacios, Guillermina Fernández, Vanesa Zchetti, Eugenia Cendoya, Silvina Zanon, Valeria Poloni, Laura Chiotta, Laura Pereyra, Gabriela Pena, Cecilia Carranza, Nicolás Pastor, Carina Pereyra, Verónica Alonso, Analía Fochesato, Juan Palazzini, Pilar Monge; a los que ya no están en el lab pero fueron gigantes: Silvina Oviedo, Francisco Casanovas, Mauricio Barberis y Pablo Copia; y a los más grandes: Dra. Laura Ramirez, Dra. Cecilia Farnochi, Dra. Sofia Chulze, Dra. Ana Dalcerro, Dra. Lilia Cavaglieri, Dra. Carina Magnoli, Dra. Cecilia Dogi), por cada día compartido, por cada momento, por no solo transmitir ciencia. También, no puedo dejar de agradecerles a todos los tesisistas (Sebastián Muñoz, Yamila Kuhn, entre muchos) y pasantes (Inés Dinolfo, Martin Quero, Joaquín Lombardelli, Paula Astolfi, Dinora Pan, Aline Dourado, Raizza Escórcio, Ygor Flávio, Rodrigo Calvet, entre muchos) que han transitado por Micología y con los cuales he compartido y aprendido muchísimo. Todos me han dejado mucho.

- Al Dr. German Barros, por ser un compañero excelente, comprensivo y de mucha llegada a los que recién se inician en esto, por compartir desde ensayo de Laboratorio hasta Maratones (Primer Maratón Héroes de Malvinas!!!, GIGANTE, no te separaste). Gracias por haberme introducido al Running.

- Al Laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Microbiología e Inmunología, por brindarme a disposición sus equipamientos y lugar de trabajo.

- Al Dr. Edgardo Jofre y en especial al Lic. Walter Ferrai, por compartir sus conocimientos y brindarme un lugar en su laboratorio.

- A la Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro y la Universidade Federal do Piauí, por hacerme sentir como en casa, por brindarme la oportunidad y conocimientos. En especial a las Doctoras Irene Coelho y Christina Muratori que

fueron mis orientadoras durante mi estadía en Seropédica y Piauí y a todos los integrantes de ambos laboratorios (BACVET; Microbiología).

- Al plantel docente de la Materia: Inmunología Veterinaria (Dr. Cecilia Greco, Dra. Noemí Rodríguez, Dra. Elizabet Witowski, Dra. Reynoso María, Dra. Cecilia Dogi, Dra. Laura González, Dra. Noelia Cariddi, Gisela García), por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

- A la comisión de Higiene y Seguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología, por permitirme formar parte, por sus enseñanzas y esfuerzos.

- Al personal de la sala de lavado del Departamento de Microbiología e Inmunología, en especial a Mari por compartir cada día de trabajo, por salvarnos, por tus chistes, por tus risas y por siempre preocuparte por el bienestar de todos.

- A mis amigos Serranenses y a las grande personas que supe encontrar en la Universidad (Microbios), por su comprensión, su apoyo incondicional y por estar siempre en cada momento.

- A Maru, por haber compartido tanto durante mucho tiempo, por formar parte de esto y por estar siempre.

- A la Universidad Nacional de Río Cuarto.


- A CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral.

- A las diferentes fuentes de financiamiento de esta tesis: CONICET PIP; Secretaria de Ciencia y Técnica de la UNRC; PICT; CAPES-SPU y MINCYT-CAPES.

Para José, mi ahijado.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Director: Dra. María Marta Reynoso



Co-director: Dra. Adriana Mabel Torres



Miembros del Jurado:

Dra. Miriam Etcheverry



Dra. Stella Castro



Dra. Graciela Vaamonde



RESUMEN

Es bien conocido que la correcta identificación de las especies de *Aspergillus* es un requisito previo esencial para evaluar el potencial deterioro y contaminación por micotoxinas en alimentos destinado tanto a la alimentación humana como animal. La taxonomía es una disciplina dinámica y los cambios en la nomenclatura de las especies fúngicas, a menudo son difíciles de entender en el campo aplicado. La inadecuada taxonomía y/o incierta nomenclatura en el género *Aspergillus*, especialmente en la sección *Nigri*, puede conducir a resultados erróneos, los que pueden deberse a: 1- cambios recientes en la nomenclatura, 2-nuevas tendencias en el estudio taxonómico, incluyendo la descripción de nuevas especies y/o 3- identificación incorrecta. Es por esto que en el presente trabajo se caracterizaron las poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes productos de interés agrícola de Argentina a través de un estudio polifásico, incluyendo datos morfológicos, fisiológicos, ecológicos y moleculares. Los resultados demostraron que el agregado *A. niger* es el grupo de especies más frecuentemente aislado como contaminante en todos los sustratos analizados, siendo el único presente en soja. En pasas de uvas, el grupo taxonómico siguiente, en orden de importancia, fue la Serie Carbonaria y *Aspergillus* Uniseriados, y en maní *Aspergillus* Uniseriados. En cuanto a la producción de micotoxinas, el 96% de las cepas identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* fueron capaces de producir Ocratoxina A (OTA), en cambio sólo el 0,63% de las pertenecientes al agregado *A. niger* produjeron dicha micotoxina. Por lo tanto, se infiere que *A. carbonarius* sería la principal especie responsable de la posible acumulación de OTA en los sustratos analizados. Además, la producción de Fumonisina B₂ por algunas cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, alerta acerca de la posible presencia de esta micotoxina en los sustratos analizados. También se desarrolló un marcador ISSR, el cual permitió evaluar la diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, cuyo análisis concordó con la identidad de los aislados basada en morfología clásica y uso de cebadores específicos. A pesar de que este marcador no permitió la categorización taxonómica de todas las especies en cuestión, resultó ser una herramienta de sumo valor cuando se debe identificar un gran número de aislados. El perfil de bandas generadas por el marcador ISSR reveló: -la presencia de un grupo de cepas identificadas morfológicamente como *Aspergillus* Uniseriados que mostraron una alta similitud genética con la cepa de referencia *A. uvarum* ITEM 4834; -la presencia de un grupo de cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes al agregado *A. niger*, que mostraron una alta similitud genética con la cepa de referencia *A. luchuensis* ANRC 703; -la presencia de dos cepas, clasificadas morfológicamente como *A. carbonarius* y no productoras de OTA, que mostraron alta similitud genética con la cepa de referencia *A. ibericus* ITEM 4776. Posteriormente, la categorización taxonómica de dichas cepas fue confirmada por análisis de la secuencia de la calmodulina como *A. uvarum*, *A. luchuensis* y *A. ibericus*, respectivamente. Además, este marcador reveló la presencia de un grupo muy homogéneo conformado por cepas aisladas de maní que no habían amplificado con los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2. El análisis de secuencias de dicho grupo reveló que las mismas eran *A. brasiliensis*, siendo esta la primera vez que se confirma la presencia de la especie en Argentina. Además, las especies de *A. tubingensis*, *A. niger/A. welwistchiae*, *A. luchuensis* y *A. brasiliensis* fueron claramente separadas por ISSR en cuatro grupos diferentes con altos valores de soporte. El análisis filogenético sugirió que las 11 cepas categorizadas como *A. brasiliensis* evolucionaron a partir de un ancestro común hipotético no compartido con la cepa de referencia evaluada. Esto podría deberse a variaciones intraespecíficas o bien podría tratarse de especies filogenéticas crípticas dentro del clado *A. brasiliensis*. El marcador SCAR desarrollado, permitió distinguir claramente *A. ibericus* de la especie estrechamente relacionada *A. carbonarius* de forma rápida, confiable y de bajo costo. Esta distinción es de suma importancia para evitar una sobreestimación de los riesgos de contaminación y toxicológicos.

ABSTRACT

It is well known that accurate taxonomic identification of *Aspergillus* species is essential to evaluate and identify the risks of mycotoxin contamination and prevention of entry into the human and animal food chain. Taxonomy is a dynamic discipline and name changes of fungi are often difficult to understand in the applied field. The inadequate taxonomy or uncertain nomenclature of genera *Aspergillus*, especially in the section *Nigri*, can therefore lead to tremendous confusion. Misidentification of strains can be traced back to 1- recent changes in nomenclature, 2- new taxonomic insights, including description of new species, and/or 3- incorrect identifications. In the present work *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from different agricultural products from Argentina were characterized through a polyphasic study, including morphological, physiological, molecular and ecological data. The results obtained showed that *A. niger* "aggregate" is the species most frequently isolated as a contaminant in all the substrates evaluated, and the unique group in soybean. Depending on the substrates, the other taxonomic group isolated was, in order of importance, Serie Carbonaria and *Aspergillus* "uniseriate" in raisins and, *Aspergillus* "uniseriate" in peanut. Related to mycotoxin production, 96% of the isolates, morphologically identified as *A. carbonarius*, were able to produce ochratoxin A (OTA), while only 0.63% of *A. niger* "aggregate" strains produced the toxin. Afterward, it was concluded that *A. carbonarius* is the main species responsible for the putative OTA accumulation in these substrates. Moreover, the fumonisin B₂ production by some isolates belonging to *A. niger* "aggregate" alert us about the possible natural occurrence of this mycotoxin. Also the development of an ISSR marker was carried out, which allowed the diversity evaluation of *Aspergillus* section *Nigri*, with results in total agreement with the identity of isolates based on classical morphology and specific primers. Despite of this marker did not allow the taxonomic categorization of each species it is a useful tool when a high number of isolates have to be identified. The use of this marker showed: - The presence of some strains morphologically identified as *Aspergillus* uniseriate, that showed a high genetic similitude with *A. uvarum* ITEM 4834; strains belonging to *A. niger* aggregate, with high genetic similitude with *A. luchuensis* ANRC 703, and strains morphologically identified as *A. carbonarius* but no-OTA producers that showed high genetic similitude with *A. ibericus* ITEM 4776. Posterior DNA sequence analysis confirmed strains as *A. uvarum*, *A. luchuensis* and *A. ibericus*, respectively. Also the marker revealed the presence of a homogeneous group constituted by strains with negative reaction with NIG1/NIG2 and TUB1/TUB2 primers. These strains were taxonomically categorized with DNA sequence analysis as *A. brasiliensis*. This species was isolated only from peanut, and is the first report of *A. brasiliensis* presence in Argentina, confirmed by molecular analysis. It is noticeable that ISSR marker clearly separated *A. tubingensis*, *A. niger/A. welwistchiae*, *A. luchuensis* and *A. brasiliensis* strains in four different groups with high support values. The phylogenetic analysis suggested that 11 strains categorized as *A. brasiliensis* evolved from a hypothetic common ancestor not shared by the reference strain. This result could be due to intraspecific variability into the *A. brasiliensis* strains or the presence of cryptic phylogenetic species into de *A. brasiliensis* clade. Based on ISSR patterns a SCAR marker was developed, this marker allowed distinguishing clearly *A. ibericus* from their closely related species *A. carbonarius* in a quick, low-cost and highly accurate test. This distinction is very important to avoid the overestimation of contamination and toxicological risks with OTA.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Género <i>Aspergillus</i>	1
I.1.1. Generalidades	1
I.1.2. Taxonomía	2
I.2. <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	2
I.2.1. Identificación mediante criterios morfológicos	7
I.2.2. Identificación mediante producción de metabolitos secundarios	13
I.2.2.1. Producción de ocratoxina A	13
I.2.2.2. Producción de fumonisinas	17
I.1.3. Identificación mediante criterios basados en el análisis del ADN	19
I.1.3.1. Especies uniseriadas	20
I.1.3.2. Especies biseriadas	22
I.1.3.2.a. Serie <i>Carbonaria</i>	22
I.1.3.2.b Agregado <i>A. niger</i>	23
I.1.4. Marcadores moleculares	30
II. HIPÓTESIS	32
III. OBJETIVOS	32
IV. MATERIALES y MÉTODOS	33
IV.1. Cepas	33
IV.2. Identificación mediante caracteres morfológico	33
IV.2.1. Medios de cultivo	33
IV.2.2. Metodología	34
IV.3. Identificación mediante métodos moleculares basados en PCR	35
IV.3.1. Cepas	35
IV.3.2. Producción de la biomasa fúngica	35
IV.3.3. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico	35
IV.3.3.1. Materiales	35
IV.3.3.2. Metodología	36
IV.3.4. Reacciones de PCR	36
IV.3.4.1. Materiales y condiciones de reacción	36
IV.3.4.2. Metodología	37
IV.4. Producción de metabolitos secundarios	38
IV.4.1. Materiales	38

IV.4.2. Producción de ocratoxina A	39
IV.4.3. Análisis estadístico	40
IV.4.4. Producción de fumonisinas	40
IV.4.4.1. Confirmación de FB ₂ por HPLC-MS/MS	41
IV.5. Evaluación de la diversidad genética de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> a través del uso de marcadores neutros, Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs)	42
IV.5.1. Optimización de un protocolo para estudiar la diversidad de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> utilizando el perfil ISSR	42
IV.5.1.1. Cepas	42
IV.5.1.2. Reacciones de PCR	42
IV.5.1.2.1. Materiales y condiciones de reacción	42
IV.5.1.2.2. Metodología	43
IV.5.1.3. Análisis de los datos	44
IV.5.2. Análisis de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> a través de ISSR	44
IV.5.2.1. Cepas	45
IV.6. Análisis de secuencias del gen calmodulina	46
IV.6.1. Cepas	46
IV.6.2. Reacciones de PCR	46
IV.6.2.1. Materiales y condiciones de reacción	46
IV.6.2.2. Metodología	46
IV.7. Diseño de cebadores específicos de especie	50
IV.7.1. Reacciones de PCR	50
IV.7.1.1. Materiales y condiciones de reacción	50
IV.7.2. Metodología	50
IV.7.3. Clonado de los fragmentos específicos	51
IV.7.3.1. Materiales	51
IV.7.3.2. Ligación	51
IV.7.3.3. Transformación bacteriana	52
IV.7.4. PCR directo de colonia	52
IV.7.5. Reacción de clivaje	52
IV.7.5.1. Metodología	52
IV.7.6. Análisis de secuencias de los fragmentos específicos	53
IV.8. Múltiple PCR utilizando los cebadores CARBO1/2 y Fibe/Ribe	54
IV.8.1. Reacciones de PCR	54
IV.8.1.1. Materiales y condiciones de reacción	54
IV.8.2. Metodología	54
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55

V.1. Identificación de las cepas mediante caracteres morfológicos	55
V.2. Identificación de las cepas mediante métodos moleculares basados en PCR	77
V.3. Análisis de metabolitos secundarios	83
V.3.1. Determinación del potencial ocratoxicogénico de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	83
V.3.2. Determinación de la producción de fumonisina B ₂ por los miembros de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	90
V.4. Evaluación de la diversidad genética de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> a través del uso de marcadores neutros, Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs)	92
V.4.1. Evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas de maní a través del uso de marcadores ISSRs	104
V.4.2. Evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas de soja a través del uso de marcadores ISSRs	108
V.4.3. Evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas de pasas de uvas a través del uso de marcadores ISSRs	112
V.5. Análisis del gen calmodulina	117
V.6. Diseño de cebadores específicos de especie	133
V.6.1. PCR directo de colonia	134
V.6.2. Reacción de clivaje	135
V.6.3. Análisis de secuencias de los fragmentos específicos	137
V.6.4. Pruebas de sensibilidad y especificidad de los cebadores diseñados	140
V.6.5. Múltiple PCR utilizando los cebadores CARBO1/2 y Fibe/Ribe	143
V.7. Resumen del estudio polifásico de 194 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	145
VI. CONCLUSIONES	149
VII. BIBLIOGRAFÍA	152
VIII. ANEXOS	172

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.	Estudio polifásico para la delimitación de especies, incluyendo datos morfológicos, fisiológicos y moleculares (Samson y col. 2007)	4
Figura I.2.	Estructura del conidióforo en las especies de <i>Aspergillus</i> .	7
Figura I.3.	Estructura química de las diferentes ocratoxinas.	15
Figura I.4.	Estructura química de las fumonisinas	18
Figura V.1.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> perteneciente al agregado <i>A. niger</i> (ANRC 703) en los medios MEA (A), CYA (B), CY20S (C) a 25°C y CYA (D) a 37°C CZ (E) durante 7 días de incubación.	56
Figura V.2.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> uniseriada (ANRC 530) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (E) y CREA (F) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.	57
Figura V.3.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> uniseriada (ANRC 426) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (C) y CREA (E) a 25°C y CYA (F) a 37°C durante 7 días de incubación.	58
Figura V.4.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>Aspergillus carbonarius</i> (ANRC 502) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (E) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.	59
Figura V.5.	Morfología de las colonias (anverso y reverso) de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> pertenecientes al agregado <i>A. niger</i> en los medios MEA (A-J) y CYA (K-T) a 25°C durante 7 días de incubación. <i>A. tubingensis</i> ITEM 4845 (A, E, J, O); <i>A. niger</i> FRR 5722 (B, F, K, P); <i>A. welwitschiae</i> FRR 5804(C, G, L, Q); <i>A. tubingensis</i> FRR 5720 (D, H, M, R); <i>A. niger</i> FRR 5695(E, I, N, S).	60
Figura V.6.	Morfología de las colonias (anverso y reverso) de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> pertenecientes al agregado <i>A. niger</i> en los medios MEA (A-J) y CYA (K-T) a 25°C durante 7 días de incubación. Cepa ANRC 517 (A, E, K, P); cepa ANRC 522 (B, G, L, Q); cepa ANRC 603 (C, H, M, R); cepa ANRC 702 (D, I, N, S); cepa ANRC 602 (E, J, O, T).	61
Figura V.6.	Continuación. Morfología de las colonias (anverso y reverso) de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> pertenecientes al agregado <i>A. niger</i> en los medios MEA (A-F) y CYA (I-P) a 25°C durante 7 días de incubación. Cepa ANRC 415 (A, D, G, J); cepa ANRC 458 (B, E, H,	62

	K); cepa ANRC 446 (C, F, I, L).	
Figura V.7.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> perteneciente al agregado <i>A. niger</i> (ANRC 704) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D) Y CY20S (E) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.	63
Figura V.8.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>A. lacticoffeatus</i> ITEM 7559, en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (E) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.	65
Figura V.9.	Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de <i>Aspergillus sclerotioniger</i> ITEM 7560, en los medios MEA (A), CYA (B), CY20S (C), CZ (D) a 25°C durante 7 días de incubación.	65
Figura V.10.	Morfología de las colonias (anverso, reverso) de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> uniseriadas de referencia; <i>Aspergillus aculeatus</i> ITEM 7046 (A, B) CYA25; (C, D) MEA; (E, F) CY20S; (G, H) CYA37; (I, J) CZ; (K, L) CREA; <i>Aspergillus japonicus</i> ITEM 7034 (M, N) CYA25; (O, P) MEA; (Q, R) CY20S; (S, T) CYA37; (U, V) CZ; (W, X) CREA durante 7 días de incubación.	66
Figura V.10.	Continuación. Morfología de las colonias (anverso, reverso) de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> uniseriadas de referencia; <i>Aspergillus uvarum</i> ITEM 4834 (A, B) CYA25; (C, D) MEA; (E, F) CY20S; (G, H) CYA37; (I, J) CZ; (K, L) CREA durante 7 días de incubación.	67
Figura V.11.	Morfología de los conidios de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> desarrollados en el medio MEA a 25° C durante 7 días de incubación observados con un aumento de 400X. (A) agregado <i>A. niger</i> (ANRC 415), (B) agregado <i>A. niger</i> (ANRC 447), (C) agregado <i>A. niger</i> (ANRC 458), (D) <i>A.</i> Uniseriado (ANRC 429) y (E) <i>Aspergillus carbonarius</i> (ANRC 514).	76
Figura V.12.	Identificación rápida de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus tubingensis</i> usando los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2 (Múltiple PCR).	78
Figura V.13.	Identificación rápida de <i>Aspergillus japonicus/A. aculeatus</i> y <i>Aspergillus carbonarius</i> usando los cebadores JAPO1/JAPO2 y CARBO1/CARBO2.	81
Figura V.14.	Producción de OTA ($\mu\text{g/ml}$) de dos cepas de <i>Aspergillus carbonarius</i> (ANRC 601; ANRC 600) en la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4 y 1/5, incubado a 30° C por 7 y 10 días.	84
Figura V.15.	Niveles de producción de OTA (ng/ml) a diferentes temperaturas y tiempos en la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4.	85

Figura V.16.	Niveles de producción de OTA (ng/ml) a diferentes temperaturas y tiempos en la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4.	87
Figura V.17.	Perfiles ISSR de las 9 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> analizadas usando el ISSR9.	93
Figura V.18.	Dendrograma de 9 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.	95
Figura V.19.	Dendrograma de 32 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.	99
Figura V.20.	Análisis de coordenadas principales del conjunto de datos ISSR derivados de las 31 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> analizadas. Se muestra las tres primeras coordenadas principales y la proporción de varianza que lo explican (Dim 1, Dim 2 and Dim 3) (3-D plot).	101
Figura V.21.	Perfiles ISSR de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> aisladas de maní usando el cebador ISSR6.	105
Figura V.22.	Dendrograma de 62 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud genética Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.	106
Figura V.23.	Perfiles ISSR de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> aisladas de soja usando el cebador ISSR6.	109
Figura V.24.	Dendrograma de 37 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud genética Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.	110
Figura V.25.	Perfiles ISSR de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> aisladas de pasas de uvas usando el cebador ISSR7	113
Figura V.26.	Dendrograma de 72 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud genética Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.	114
Figura V.27a.	Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del calmodulina de las 111 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> del presente estudio y de las 31	118

	cepas de las secuencias disponibles en el GenBank.	
Figura V.27b	Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del calmodulina de las 111 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank.	119
Figura V.27c.	Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del calmodulina de las 111 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank.	120
Figura V.28.	Árbol consenso de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de calmodulina de las 111 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank.	122
Figura V.29.	Mapa de sinapomorfias comunes de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados. En la parte superior de las ramas se muestra los caracteres sinapomorficos.	123
Figura V.30.	Bandas polimórficas únicas de especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> utilizando diferentes cebadores ISSR	134
Figura V.31.	PCR directo de colonia utilizando los cebadores M13F y M13R de 4 clones conteniendo fragmentos específicos de especie en el vector p-GEM T easy.	135
Figura V.32.	Extracción de plásmido y reacción de clivaje utilizando la enzima <i>EcoRI</i> .	136
Figura V.33.	Secuencia del fragmento específico de las cepas de <i>A. acidus</i> obtenida por ISSR.	139
Figura V.34.	Secuencia del fragmento específico de las cepas de <i>A. japonicus</i> obtenida por ISSR.	139
Figura V.35.	Secuencia del fragmento específico de las cepas de <i>A. ibericus</i> obtenida por ISSR.	140
Figura V.36.	Productos de amplificación para evaluar la especificidad del método Fibe/Ribe (189 pb).	142
Figura V.37.	Productos de amplificación utilizando distintas concentraciones de ADN para evaluar la sensibilidad del método Fibe/Ribe.	143
Figura V.38.	Productos de amplificación para evaluar la especificidad del método múltiple PCR para la detección específica de <i>A. ibericus</i> (189pb) y <i>A. carbonarius</i> (375pb).	144
Figura V.39.	Especies y porcentajes de aislamiento en pasas de uvas.	147

Figura V.40.	Especies y porcentajes de aislamiento en maní.	147
Figura V.41.	Especies y porcentajes de aislamiento en soja.	148
Figura V.42.	Especies y porcentajes de aislamiento en almendra, pimienta, uvas, residuos de cervecería y suelo.	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.	Especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> , fuente de aislamiento y origen geográfico.	5
Tabla I.2.	Criterios morfológicos para la distinción de especies pertenecientes a <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .	9
Tabla I.3.	Especies propuestas en <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> según diferentes autores.	11
Tabla I.4.	Herramientas moleculares aplicadas para la identificación de las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .	28
Tabla IV.1.	Secuencia de los cebadores y tamaño de los productos de amplificación utilizados para distinguir las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .	38
Tabla IV.2.	Secuencias y temperaturas de apareamiento de los cebadores ISSR usados como técnica fingerprint en <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .	43
Tabla IV.3.	Cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> seleccionadas al azar, provenientes de diferentes sustratos y diferentes regiones geográficas evaluadas a través del marcador ISSR.	45
Tabla IV.4.	Secuencias y cepas usadas en el análisis de parsimonia.	48
Tabla V.1	Número de cepas identificadas como <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> en los diferentes sustratos.	55
Tabla V.2.	Características morfológicas de diferentes especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> observadas en el presente estudio.	70
Tabla V.3.	Número de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> aisladas de diferentes sustratos que fueron identificadas mediante cebadores específicos de especie.	79
Tabla V.4.	Producción de FB2 de cepas pertenecientes al agregado <i>A. niger</i> aisladas de diferentes sustratos.	91
Tabla V.5.	Características principales de los cebadores de ISSR seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> .	94
Tabla V.6.	Similitud genética entre las especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> obtenidas usando los 12 cebadores de ISSR seleccionados.	96
Tabla V.7.	Cebadores de ISSR seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> y sus características principales.	98
Tabla V.8	Nodos del consenso que permiten la monofilia de las especies	127

	críticas <i>A. niger</i> / <i>A. welwitschiae</i> .	
Tabla V.9.	Nodos del consenso que permiten la monofilia de especie <i>A. brasiliensis</i> .	130
Tabla V.10.	Nodos del consenso que permiten la monofilia de las especies pertenecientes a la Serie <i>Carbonaria</i>	131
Tabla V.11.	Resultado de la búsqueda de BLAST	138
Tabla V.12.	Secuencia de los cebadores y tamaño de los productos de amplificación esperados.	140

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Género *Aspergillus*

I.1.1. Generalidades

El género *Aspergillus* Haller 1768 comprende a un gran grupo de especies fúngicas que ocupan diversos nichos ecológicos. Aunque los miembros de este género son los organismos más abundantes y ampliamente distribuidos por todo el mundo, se aíslan con mayor frecuencia en climas templados y subtropicales entre las latitudes 26° a 35° Norte o Sur del Ecuador (Klich 2002).

El mayor impacto económico positivo del género es a nivel de la producción industrial de enzimas (amilasas) y ácidos orgánicos (ácido cítrico) producidos por un número variado de especies, como así también la producción de terapéuticos (Hara y col., 1992; van den Hondel y col., 1992; Ward y col., 1992). Además, tienen efectos beneficiosos desde el punto de vista ecológico, ya que son degradadores importantes de desechos de cosechas y pueden jugar roles diversos en la solubilización y reciclaje de los nutrientes del suelo (Griffin & Garren 1976). Como patógenos de insectos, estos hongos pueden ser utilizados para limitar las poblaciones de los mismos (Wadhvani & Srivastava 1985) y han sido considerados agentes potenciales para reemplazar insecticidas químicos (Roberts & Yendol 1971).

Desafortunadamente, el impacto benéfico de este género y sus metabolitos son más que compensados por los aspectos negativos. El mayor impacto en la agricultura es en la degradación saprofitica de diversos productos agrícolas antes y después de la cosecha y la producción de metabolitos tóxicos (micotoxinas) que pueden afectar tanto al hombre como los animales. Las especies de este género rara vez son patógenos de plantas directamente en el campo, aunque *A. flavus* ha sido reportado como un patógeno de plántulas de maní y *A. niger* es el agente causal de la podredumbre de la corona de maní. Prácticamente las especies de *Aspergillus* han sido aisladas de productos agrícolas en cualquier etapa de su producción (Domsch y col., 1980; Pitt & Hocking 1997; Samson y col., 2000).

Determinados miembros del género *Aspergillus* también son alergénicos (aspergilosis bronquiopulmonar alérgica), y patógenos para el hombre y los animales (aspergilosis pulmonar invasiva), representando un riesgo potencial para la salud (Rinaldi 1983). La mayoría de las enfermedades humanas causadas por las

especies de *Aspergillus* (aspergilosis) están asociadas con la inmunosupresión. *Aspergillus fumigatus* está involucrado en alrededor del 90% de aspergilosis humana, seguido por *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. ochraceus* (Bossche y col., 1988; Young 1990; Dixon & Wals 1992; Latge 1999).

I.1.2. Taxonomía

Debido a su importancia económica, *Aspergillus* es uno de los géneros de hongos filamentosos más estudiados en la actualidad. Micheli (1729) dio el nombre de *Aspergillus* al estado imperfecto (anamorfo) del hongo. Más tarde, el estado perfecto (teleomorfo) fue descubierto para algunas de las especies de *Aspergillus*, lo cual creó cierto grado de confusión acerca de la taxonomía del género.

Raper & Fennell (1965) elaboraron la monografía más completa del género *Aspergillus* y ellos aceptaron 12 especies y dos variedades dentro del grupo que denominaron *Aspergillus niger*. Las especies dentro de este grupo descritas con posterioridad no fueron aceptadas en la revisión realizada por Samson (1979). Posteriormente, Al-Mussallam (1980) y Kozakiewicz (1989) realizaron nuevas aportes a la taxonomía de las especies del grupo *A. niger*. Gams y col. (1985) reclasificaron el género *Aspergillus* siguiendo las normas del código de nomenclatura botánica e introdujeron la sección *Nigri*, incluida dentro del subgénero *Circumdati*. *Aspergillus niger* fue considerada la especie tipo de la sección. La taxonomía tradicional de *Aspergillus* basada solamente en características fenotípicas, da una adecuada delimitación de taxones. Sin embargo, varias secciones del género presentan muchas variaciones morfológicas, resultando en esquemas taxonómicos discutibles.

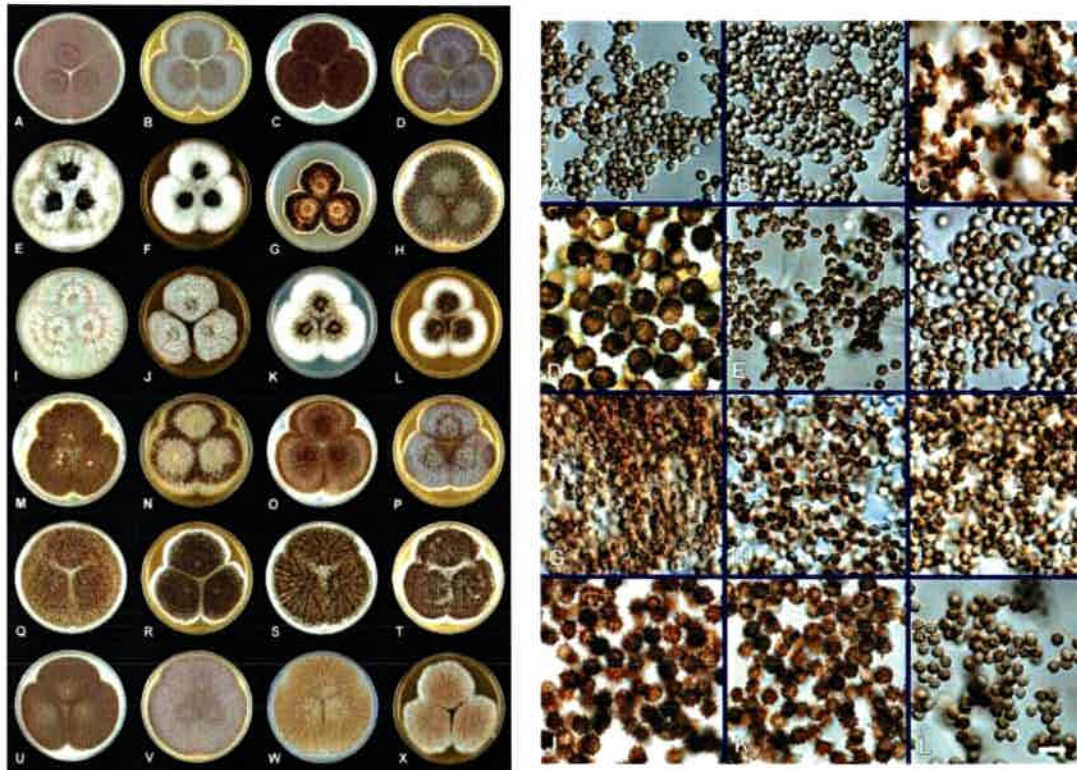
La taxonomía de *Aspergillus* y sus teleomorfos ha sido recientemente revisada mediante el uso de un enfoque polifásico con el fin de examinar la variabilidad dentro de especie. Diferentes cepas de *Aspergillus* fueron estudiadas por su macro y micromorfología, características de crecimiento, perfil de extrolitos y secuencias conservadas (genes de la calmodulina, β -tubulina, entre otras) (Samson y col., 2006; Varga y col., 2011).

I.2. *Aspergillus* sección *Nigri*

Dentro del género *Aspergillus*, los miembros de la sección *Nigri* son unos de los de mayor importancia, ya que son de distribución ubicua y pueden ser aislados a partir

de una gran variedad de sustratos, incluyendo semillas, granos, forrajes, piensos, frutas, verduras y cuero, entre otros, siendo especialmente abundantes en suelos de las áreas tropicales y subtropicales (Tabla I.1).

La sección *Nigri* se encuentra dentro del subgénero *Circumdati* descrito por Gams y col. (1985). La taxonomía de esta sección es una de las más complejas dentro del género *Aspergillus*, y ha dado lugar a diferentes propuestas taxonómicas (Abarca y col., 2004). Los errores en la clasificación de las especies de este género se deben, básicamente, a que muchas veces las diferencias descritas entre los distintos taxones son muy sutiles. Además, es común identificar todas las colonias de *Aspergillus* de coloración negruzca como *A. niger*. Actualmente, se recomienda realizar un estudio polifásico para la delimitación de especies dentro del género *Aspergillus*, incluyendo datos morfológicos, moleculares, fisiológicos y ecológicos (Samson y col., 2007).



Species	Extrólitos producidos
<i>A. aculeatus</i>	nosoflín, secalónico ácido D, secalónico ácido F, aculeatós
<i>A. aculeatus</i>	secalónico ácido D, secalónico ácido F
<i>A. brasiliensis</i>	naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pirophen, tensidol A & B
<i>A. carbonarius</i>	ochratoxinas (A, B, α , β), naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A
<i>A. costaricensis</i>	alfavíninas* lunalenone, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B)
<i>A. ellipticus</i>	autófol, candidulín, terpenilín, cl. xanthosól
<i>A. foetidus</i>	antalanónico (only some strains), asperazín, lunalenone, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A, (nigraglín)
<i>A. heteromorphus</i>	lots of highly unique extrólitos including indol-alkaloids, none of them structure elucidated
<i>A. homomorphus</i>	dihydrocarbónico ácido, secalónico ácido D, secalónico ácido F
<i>A. ibeticus</i>	naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A
<i>A. japonicus</i>	cytotoxicín, festuavín
<i>A. lactifluus</i>	lolanín, ochratoxín A, pyranonigrin A, tensidol A & B
<i>A. niger</i>	lunalenone, ochratoxín A (only some strains), malformín, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A, tensidol A & B, (nigraglín)
<i>A. pipis</i>	alfavíninas, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A
<i>A. sclerotiocarbonarius</i>	naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A, three unique indol-alkaloids at retention indices 1475, 1676 and 1838.
<i>A. sclerotioniger</i>	corymbiferan lactones, lunalenone, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), ochratoxinas (A, B, α , β), pyranonigrin A
<i>A. tubingensis</i>	asperazín, lunalenone, malformín, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), pyranonigrin A, tensidol A & B, (nigraglín)
<i>A. uvarum</i>	asteric ácido, dihydrogeodín, eridín, geodín, secalónico ácido D and F
<i>A. vadenis</i>	nigraglín, asperazín, naphtho- γ -pirones (incluyendo aurasperone B), a polar orlandin-like compound

*alfavíninas are: 14-epi-14-hydroxy-10,23-dihydro-24,25-dehydroalfavínine, 10,23-dihydro-24,25-dehydroalfavínine and 10,23-dihydro-24,25-dehydro-21-oxo-alfavínine

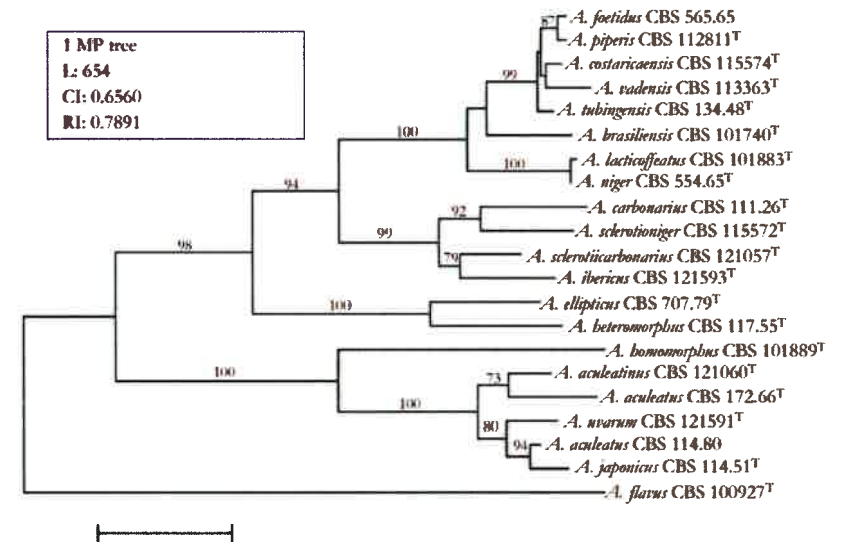


Figura 1.1. Estudio polifásico para la delimitación de especies, incluyendo datos morfológicos, fisiológicos y moleculares (Samson y col. 2007)

Tabla I.1. Especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, fuente de aislamiento y origen geográfico.

Especies Biseriadas	Sustrato	Origen geográfico	Referencia
<i>A. brasiliensis</i>	Suelo, uvas.	Brasil, Portugal, Australia, Estados Unidos, Holanda, entre otros	Vargas y col. (2007)
<i>A. carbonarius</i>	Uvas, cocoa, café, especias, suelo, pasas de uvas, frutas secas, aire	Argentina, Italia, España, Brasil, Estados Unidos, entre otros.	Chiotta y col. (2009); Perrone y col. (2007)
<i>A. luchuensis</i>	Tomate, uvas, frutas, té.	China, India, Japón, Argentina, entre otros	Mogensen y col. (2009);
<i>A. ibericus</i>	Uvas	Península Ibérica	Serra y col. (2006); Perrone y col. (2007)
<i>A. welwistchiae</i>	Uvas, cocoa, café, suelo, dátiles, entre otros.	Argentina	Magnoli y col. (2004); Hong y col. (2013)
<i>A. tubingensis</i>	Uvas, cocoa, cereales, café, suelo	Argentina	Perrone y col (2007); Barberis y col. (2013)
<i>A. costaricensis</i>	Suelo	Costa Rica	Samson y col. (2004)
<i>A. ellipticus</i>	Suelo	Costa Rica	Abarca y col. (2004)
<i>A. eucalypticola</i>	Eucalipto	Australia	Varga y col. (2011)
<i>A. heteromorfus</i>	Contaminación de cultivo	Brasil	Abarca y col. (2004)
<i>A. homomorfus</i>	Suelo y uvas	Israel y Argentina	Chiotta y col. (2011)
<i>A. neoniger</i>	Desierto y Agua de Mangle	Namibia y Venezuela	Varga y col. (2011)
<i>A. piperis</i>	Pimienta	Dinamarca	Samson y col. (2004)
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	Café	Tailandia	Nooim y col. (2008)
<i>A. vadensis</i>	Desconocido		De Vries y col. (2005)

Tabla I.1. Continuación

Especies Uniseriadas	Sustrato	Origen geográfico	Referencia
<i>A. aculeatus</i>	Uva, papaya, pistacho, arroz, tomate		Parenicova y col. (2001)
<i>A. japonicus</i>	Uvas, café verde, piña, semillas de sésamo	Argentina	Parenicova y col. (2001)
<i>A. uvarum</i>	Uvas, Ambientes internos y externos	Península Ibérica, Estados Unidos	Perrone y col. (2008); Jurjević y col. (2012)
<i>A. fijiensis</i>	Suelo y Lactuca sativa	Fiji y Indonesia	Varga y col. (2011)
<i>A. aculeatinus</i>	Café	Tailandia	Nooim y col. (2008)
<i>A. indologenus</i>	Suelo	India	Varga y col. (2011)
<i>A. saccharolyticus</i>	Madera	Dinamarca	Sørensen y col. (2011)
<i>A. violaceofuscus</i>	Suelo y ambientes marinos	Francia, Puerto Rico y Bahamas	Varga y col. (2011)
<i>A. floridensis</i>	Suelo y Ambientes internos y externos	Estados Unidos, Republica Checa, Japón y Tailandia	Jurjević y col. (2012)
<i>A. trinidadensis</i>	Ambientes internos y externos	Estados Unidos y Trinidad y Tobago	Jurjević y col. (2012)

I.2.1. Identificación mediante criterios morfológicos

En la monografía elaborada por Raper & Fennell (1965), todas las especies de *Aspergillus* con cabeza conidial oscura se incluyeron en el grupo *A. niger*. En este grupo se incluyeron 12 especies y 2 variedades, separadas principalmente por la estructura del conidióforo: uniseriado y biseriado, dependiendo si tenían una (sólo fiálides) o dos capas de células (métulas y fiálides), respectivamente (Figura I.1), color de la colonia y de la cabeza conidial, la forma y ornamentación de los conidios y la velocidad de crecimiento de agar Czapek.

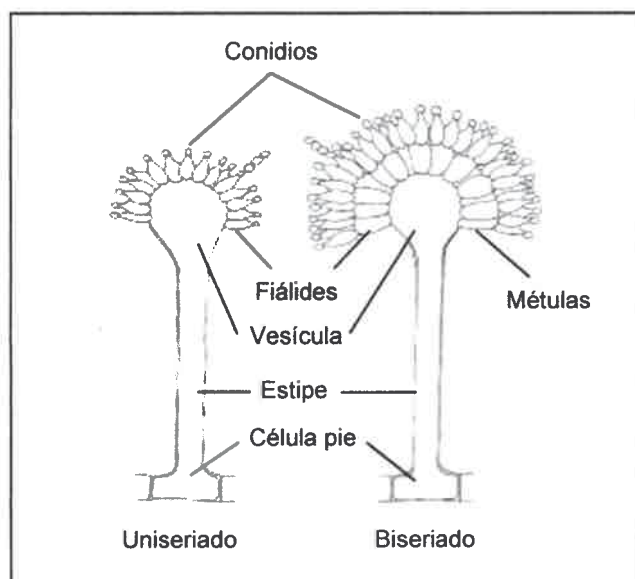


Figura I.2. Estructura del conidióforo en las especies de *Aspergillus*

Al-Mussallam (1980) revisó la taxonomía de este grupo considerando características morfológicas y de cultivo de 7 y 14 días de incubación. Teniendo en cuenta estos caracteres, propuso su división en 5 especies fácilmente distinguibles entre sí (*A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. helicothrix*, *A. ellipticus* y *A. heteromorphus*) y, el agregado *A. niger* formado por dos especies, *A. foetidus* y *A. niger*, ésta última a su vez dividida en 6 variedades y 2 formas. El agregado *A. niger* se caracterizaba por presentar colonias con tonalidades negruzcas y conidios más o menos globosos, de diámetros inferiores a $5 \mu\text{m}$ y una ornamentación más o menos marcada. Las dos especies que integraban el agregado (*A. niger* y *A. foetidus*) se diferenciaban por el diámetro de las colonias, y las divisiones en variedades y formas se basaban en el grado de rugosidad y ornamentación de los conidios. La especie *A. carbonarius* se

reconocía fácilmente por el gran tamaño de sus conidios, de más de 6 μm de diámetro. Las especies *A. ellipticus*, *A. heteromorphus* y *A. helicothrix* presentaban respectivamente conidios, métulas o esclerocios con formas muy características. *Aspergillus japonicus*, la única especie uniseriada, incluía dos variedades: *A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus* que se distinguían por el tamaño de las vesículas y la forma de los conidios.

Kozakiewicz (1989) constató que la maduración de los conidios de estas especies es muy lenta, siendo de hasta 5 semanas en el caso de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*. Desestimó por tanto la clasificación de Al-Mussallam (1980) e hizo una nueva propuesta basada en la ornamentación de los conidios utilizando técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Distinguió dos patrones de ornamentación conidial: conidios verrucosos o conidios espinosos y dividió la sección en 10 especies y 8 variedades. El agregado quedó dividido en 3 especies: *A. acidus*, *A. citricus* (*A. foetidus*) y *A. niger*.

Accensi y col. (1999) realizaron un estudio morfológico, teniendo en cuenta caracteres macroscópicos y microscópicos, de 92 aislamientos incluyendo cepas de colección representativas de las diferentes especies del agregado *A. niger*. Las medidas registradas de todas las cepas fueron razonablemente coherentes, pero los rangos se superponían, por lo que estos caracteres ofrecían poco valor para la diferenciación de especies del agregado *A. niger*.

En todas las clasificaciones propuestas, la delimitación de algunas especies es problemática debido a que ellas son distinguidas por diferencias relativamente pequeñas. En los últimos años, se han utilizado diferentes caracteres bioquímicos y moleculares para desarrollar métodos rápidos y fiables para la identificación de las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*. Abarca y col. (2004) realizaron una revisión de la sección *Nigri* con el fin de ofrecer una visión general de la problemática taxonómica y la importancia de los miembros de esta sección. Estos autores propusieron una sencilla clave taxonómica para identificar las especies más comunes de la sección utilizando criterios morfológicos (Tabla 1.2).

Samson y col. (2004) han aceptado 15 taxones incluyendo 2 especies uniseriadas (*A. aculeatus* y *A. japonicus*) y 13 especies biseriadas (*A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotiumniger*, *A. tubingensis* y *A. vadensis*). Esta clasificación se basa en características morfológicas (morfología colonial, tamaño y tipo de conidio, crecimiento en diferentes medios de cultivo y estudios a diferentes

temperaturas de incubación), perfil de extrolitos y herramientas moleculares (análisis filogenético de secuencias de la región ITS del ARNr, genes de la calmodulina y β -tubulina), siendo éste el primer enfoque polifásico utilizado para la resolver la taxonomía de la sección.

Tabla I.2. Criterios morfológicos para la distinción de especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri*.

1. <i>Aspergillus</i> uniseriados	<i>A. japonicus</i> / <i>A. aculeatus</i> ^a
1. <i>Aspergillus</i> biseriados	2 ^b
2. Conidios mayores a 6 μ m de diámetro	<i>A. carbonarius</i>
2. Conidios menores a 6 μ m de diámetro	Agregado <i>A. niger</i> ^c

^a *A. japonicus* y *A. aculeatus* distinción de especies en discusión.

^b *A. helicothrix*, *A. ellipticus* y *A. heteromorphus* no se incluyen en la clave, ya que son especies muy poco comunes.

^c Los datos moleculares indican que el agregado *A. niger* se puede dividir en dos, tres o incluso cuatro taxones. No es posible distinguir entre ellos utilizando criterios morfológicos.

En los últimos años, con la implementación de estudios polifásicos de clasificación, se describieron nuevas especies y reclasificaron otras como: *A. aculeatinus* y *A. sclerotiicarbonarius* (Noonim y col., 2008); *Aspergillus saccharolyticus* (Sørensen y col., 2011); *A. neoniger*, *A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A. indologenus*, *A. niger* (= *A. foetidus*=*A. lacticoffeatus*) y *A. acidus* (anteriormente clasificado como *A. foetidus* var. *acidus*) (= *A. coreanus*) (Varga y col., 2011); *A. floridensis* y *Aspergillus trinidadensis* (Jurjević y col., 2012).

Recientemente, Hong y col. (2013) realizaron una revisión taxonómica de varias especies del género *Aspergillus* sección *Nigri* asociada a la fermentación de alimentos en Asia Oriental. Los mismos concluyeron que *A. luchuensis*, *A. kawachii* y *A. acidus* eran la misma especie, y en base a la prioridad, *A. luchuensis* fue seleccionado como el nombre correcto. Además, en dicho trabajo demostraron que el neotipo de *A. awamori* (CBS 557.65 = NRRL 4948) no había sido aislado de la fermentación de awamori, y que por otro lado, es idéntico al taxón de *A. welwitschiae*.

El nombre de *A. welwitschiae* fue utilizado por primera vez por Wehmer y col. (1907), posteriormente varios autores aislaron dicha especie de *Welwitschia mirabilis* y en su mayoría lo denominaron *A. niger* o *A. niger* var. *phoenicis* (Cooper-Driver y col., 2000; Pekarek y col., 2006; Whitaker y col., 2008). Recientemente, dicha especie ha

sido aislada de otros sustratos que incluyen uva (Perrone y col., 2011) y cebolla (Varga y col., 2012), donde se la describe como productora de micotoxinas. El problema de la ubicación taxonómica de la cepa CBS 557.65 (= NRRL 4948), comienza en 1965 cuando Raper y Fennell la utilizan para la descripción de *A. awamori*, siendo que la misma no es originaria del alimento awamori-Koji. Posteriormente, Al-Musallam y col. (1980) la designa como neotipo *A. niger* var. *awamori*. Sobre la base de ésta clasificación Perrone y col. (2011), mediante análisis multigénicos, restablecieron a *A. awamori* como una filoespecie críptica de *A. niger*. Si bien, el nombre *A. awamori* se utilizó taxonómicamente en forma correcta por Perrone y col. (2011), actualmente el nombre es considerado engañoso, ya que, como se menciona, rara vez esta especie se aísla de procesos de fermentación de awamori, donde mayormente *A. niger* y *A. luchuensis* son predominantes (Yamada y col., 2011). Es por esto que Hong y col. (2013) concluyeron que la especie filogenética descrita por Perrone y col. (2011) como *A. awamori*, se renombre como *A. welwitschiae*.

En la tabla I.3 se resume las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* propuestas por Raper y Fennell (1965), Al-Musallam (1980), Kozakiewicz (1989), Samson y col. (2004), Varga y col. (2011) y Hong y col. (2013).

Tabla I.3. Especies propuestas en *Aspergillus* sección *Nigri* según diferentes autores.

Raper & Fennell (1965)	Al-Musallam (1980)	Kozakiewicz (1989)	Análisis de RFLP*	Samson y col., (2004)	Varga y col., (2011)	Hong y col., (2013)
<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i> var. <i>japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	
<i>A. aculeatus</i>	<i>A. japonicus</i> var. <i>aculeatus</i>	<i>A. atroviolaceus</i>	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. aculeatus</i> <i>A. aculeatinus</i> (Nooim y col., 2008) <i>A. uvarum</i> (Perrone y col., 2007) <i>A. indologenus</i> (Jurjević y col., 2012) <i>A. fijiensis</i> (Jurjević y col., 2012) <i>A. saccharolyticus</i> (Sørensen y col., 2011)	
<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i> <i>A. fonsecaeus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	
<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	<i>A. heteromorphus</i>	
<i>A. ellipticus</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. helicothrix</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. helicothrix</i>	<i>A. ellipticus</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. sclerotioniger</i> <i>A. homomorphus</i>	<i>A. ellipticus</i> <i>A. sclerotioniger</i> <i>A. homomorphus</i>	
Agregado <i>A. niger</i>					<i>A. ibericus</i> <i>A. sclerotii carbonarius</i> (Nooim y col., 2008)	
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> <i>A. lacticoffeatus</i>	<i>A. niger</i>	
<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i> var. <i>f. hennebergii</i>	<i>A. niger</i> var. <i>tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	
<i>A. phoenicis</i>	<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i>	<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. foetidus</i>		

Tabla I.3. Continuación

<i>A. pulverulentus</i>	<i>A. niger</i> var. <i>pulverulentus</i> <i>f. pulverulentus</i>	<i>A. niger</i> var. <i>pulverulentus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i> (Varga y col., 2007)	<i>A. brasiliensis</i>
<i>A. awamori</i>	<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>	<i>A. niger</i> var. <i>awamori</i>			<i>A. awamori</i> (Perrone y col., 2011) <i>A. welwitschiae</i>
<i>A. ficurum</i>	<i>A. niger</i> var. <i>nanus</i>			<i>A. piperis</i>	<i>A. piperis</i>
<i>A. foetidus</i>	<i>A. niger</i> var. <i>usamii</i>	<i>A. niger</i> var. <i>ficuum</i>			
<i>A. foetidus</i> var. <i>pallidus</i>	<i>A. niger</i> var. <i>intermedius</i>	<i>A. citrus</i> var. <i>citrus</i>			
<i>A. foetidus</i> var. <i>acidus</i>	<i>A. foetidus</i>	<i>A. acidus</i> <i>A. citrus</i> var. <i>pallidus</i>			<i>A. acidus</i> <i>A. luchuensis</i>
					<i>A. eucalypticola</i> <i>A. neoniger</i>
				<i>A. costaricensis</i> <i>A. vadensis</i>	<i>A. costaricensis</i> <i>A. vadensis</i>

*Resultado de varios análisis de RLFP por diferentes autores: Kusters-van Someren y col., (1991); Megnegneu y col., (1993); Varga y col., (1993, 1994); Accensi y col., (1999); Parenicova y col., (1997, 2001).

I.2.2. Identificación mediante producción de metabolitos secundarios

Los exo-metabolitos, metabolitos de la pared celular y algunos endo-metabolitos son producidos como una reacción al ambiente biótico y abiótico (Thrane y col., 2007). Los exo-metabolitos secretados son metabolitos secundarios, ácidos orgánicos, enzimas extracelulares, y otras proteínas bioactivas. Los metabolitos de la pared celular son compuestos estructurales (melanina, glucano, etc.), epítopes y ciertos policétidos y alcaloides que probablemente protegen a los propágulos fúngicos (Janzen 1977; Rohlfs y col., 2005). Los endo-metabolitos son principalmente metabolitos primarios los cuales no tienen interés taxonómico. Las moléculas más usadas en el reconocimiento de especies han sido los metabolitos secundarios debido a que el perfil de ellos son altamente específicos de especie (Frisvad y col., 1998; Larsen y col., 2005). En otras palabras, todas las especies producen una única combinación de diferentes tipos de compuestos orgánicos tales como policéticos, péptidos no ribosomales, terpenoides, micotoxinas, así como muchos otros compuestos de diverso origen biosintético. Algunos de estos compuestos son específicos de una única especie. Por ejemplo, las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* se caracterizan por un perfil específico (Samson y col., 2007) que muestra relaciones entre las especies. Basado en tales perfiles, se puede observar un perfil "quimiofilogenético" dentro de esta sección o al menos una concordancia entre los grupos taxonómicos y filogenéticos (Frisvad y col., 2007a). La clasificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* usando caracteres morfológicos y químicos dan como resultados agrupamientos similares a los que se producen si se usa secuenciación del gen de la β -tubulina (Samson y col., 2004; Perrone y col., 2007).

I.2.2.1. Producción de ocratoxina A

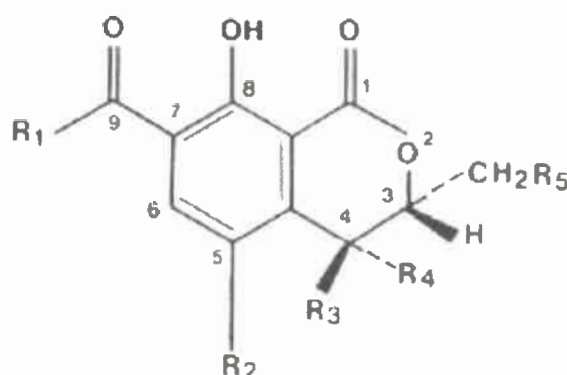
Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium* (Sidhu 2002). Estas sustancias químicas presentes en la naturaleza se pueden formar en una gran variedad de productos agrícolas y en una amplia gama de situaciones. La acumulación de éstos representa una amenaza importante para la salud humana y la sanidad animal, ya que tienen efectos negativos agudos y/o crónicos sobre ellos.

Las micotoxinas pueden afectar numerosos órganos y sistemas, en particular el hígado, los riñones, el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmunitario.

La mayor preocupación se debe a los efectos crónicos en niveles bajos de exposición, habiendo sido clasificadas varias de ellas como carcinógenos o posibles carcinógenos para los seres humanos. Son significativas las pérdidas económicas asociadas con sus efectos en la salud humana, la productividad animal y el comercio tanto nacional como internacional. Se estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, incluidos muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas. Según las estimaciones de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), las pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a las micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año (FAO, 2010).

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas producidas por diversas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos metabolitos fúngicos son ácidos orgánicos débiles y, entre los diferentes tipos, la ocratoxina A (OTA) es la que presenta mayor toxicidad. Estructuralmente, la OTA es una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida, es muy estable y se requiere una exposición de varios minutos a temperaturas superiores a 250° C para disminuir su concentración (Boudra y col., 1995; EFSA 2006). La ocratoxina B (OTB) es un derivado no clorado de la OTA y es significativamente menos tóxica tanto *in vitro* como *in vivo*. La ocratoxina C (OTC) es el éster de la OTA y su posible potencial tóxico, aunque se considera prácticamente nulo, se ha descrito específicamente sobre algunas línea celulares de monocitos en el hombre (O'Brien & Dietrich, 2005).

La ocratoxina α (OTα) y la ocratoxina β (OTβ) son productos de hidrólisis de la OTA y OTB respectivamente, no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran tóxicos (Kuiper-Goodman & Scott 1989; O'Brien & Dietrich, 2005). En la figura I.2. se muestra la estructura química de las diferentes ocratoxinas.



R1	R2	R3	R4	R5	
Fenilalanina	Cl	H	H	H	Ocratoxina A
Fenilalanina	H	H	H	H	Ocratoxina B
Fenilalanina, etil éster	Cl	H	H	H	Ocratoxina C
OH	Cl	H	H	H	Ocratoxina α
OH	H	H	H	H	Ocratoxina β

Figura 1.3. Estructura química de las diferentes ocratoxinas.

En 1993, la IARC (Agencia Internacional del cáncer) clasificó a la OTA dentro del grupo 2B reconociéndola como posible carcinógeno para humanos, en base a que existe evidencia experimental suficiente de carcinogenicidad en animales e insuficiente en humanos. La carcinogenicidad de OTA ha sido establecida en roedores en estudios a largo plazo, siendo el riñón el sitio principal y el hígado el secundario de formación de tumores (EFSA 2006). Se ha asociado con una enfermedad humana, nefropatía endémica de los Balcanes, y en el desarrollo de tumores del tracto urinario y enfermedades renales en Túnez y Egipto (Creppy 1999; Peraica y col., 1999). Es también teratogénica, carcinogénica y claramente un agente inmunosupresor.

Desde su descubrimiento en 1965, la producción de OTA se asocia a *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*. No obstante, la incidencia y distribución habitual de estas especies no permite explicar la elevada presencia de OTA en una gran variedad de alimentos. Actualmente, hay más de 20 especies citadas como productoras de OTA pertenecientes al género *Aspergillus* (Abarca y col., 1997; Frisvad y col., 2004; Samson y col., 2004). Sin embargo, pocas de ellas son conocidas por ser regularmente la fuente de contaminación de OTA en alimentos.

Diferentes estudios han mostrado que las especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* son capaces de producir OTA (Abarca y col., 1994, 2001; Teren y col., 1996; Bragulat y col., 1998; Perrone y col., 2007); dichas especies han adquirido importancia por su naturaleza ubicua y su utilización en la industria alimenticia. Dentro de la sección *Nigri*, las especies productoras de OTA pertenecen a la Serie Carbonaria (*A. carbonarius* y *A. sclerotioniger*) y las incluidas en el agregado *A. niger* (*A. niger* y *A. welwitschiae*). La capacidad de las especies uniseriadas para producir dicha micotoxina se ha mencionado (Dalcero y col., 2002; Battilani y col., 2003a) aunque debería ser confirmado, ya que por el momento no se consideran como especies productoras (Perrone y col., 2007).

Si bien *A. carbonarius* presenta una distribución menor que las especies incluidas dentro del agregado *A. niger*, entre el 70 y el 100% de sus cepas son productoras de OTA en cultivos puros (Heenan y col., 1998; Cabañes y col., 2002; Taniwaki y col., 2003; Leong y col., 2004; Serra y col., 2005; Perrone y col., 2006a). Entre las especies incluidas en el agregado *A. niger* el porcentaje de cepas productoras varía entre el 0,6 al 50% (Abarca y col., 1994, 2004; Wicklow y col., 1996; Perrone y col., 2007).

La capacidad de producir OTA es una propiedad inherente en *A. carbonarius* y por esta razón, es muy poco frecuente encontrar cepas de *A. carbonarius* no toxicogénicas en sustratos naturales. Recientemente, Cabañes y col. (2012) describieron por primera vez tres cepas de *A. carbonarius* no toxicogénicas, las cuales fueron caracterizadas profundamente (incluyendo secuenciación de los genes de la región ITS-5.8S ARNr, genes de la β -tubulina y calmodulina) y las compararon con otras cepas ocratoxigénicas de la misma especie. Además, evaluaron los genes de la policétido sintetasa (PKS), ya que se conoce que participan en la biosíntesis de OTA. La importancia en estas cepas radica en que podrían ser útiles como agentes biotecnológicos en la industria alimentaria o también podrían ser utilizados como agentes biológicos para el control de la producción de OTA en viñedos y otros cultivos.

Diversos estudios han demostrado que las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* son la principal fuente de OTA en productos tales como vino (Cabañes y col., 2002) uvas (Da Rocha Rosa y col., 2002; Sage y col., 2002; Battilani y col., 2003b; Magnoli y col., 2003) pasas de uvas (Heenan y col., 1998; Abarca y col., 2003) y café (Teren y col., 1997; Joosten y col., 2001; Urbano y col., 2001; Taniwaki y col., 2003).

Recientemente, se han descrito nuevas especies productoras de OTA aisladas de café (por ejemplo, *A. lacticoffeatus* (= *A. niger*), *A. sclerotioniger*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii*) (Frisvad y col., 2004; Samson y col., 2004), y otros resultados indican que

A. westerdijkiae, *A. steynii*, *A. ochraceus*, *A. niger* y *A. carbonarius* son responsables de la formación de OTA en estos productos (Vega y col., 2006; Mata y col., 2007).

La producción de OTA es un carácter usado con fines taxonómicos en la clasificación y en la identificación de las especies. Como es bien sabido, una dificultad en los esquemas de identificación es que los resultados de las pruebas de caracterización pueden variar dependiendo de las diferentes condiciones, tales como, temperatura y tiempo de incubación, composición del medio de cultivo, y los criterios usados para definir una producción positiva o negativa de una determinada micotoxina o un extrolito. En general, la presencia de metabolitos secundarios es un fuerte carácter taxonómico, mientras que la ausencia del mismo simplemente no es informativa. La producción de OTA es muy consistente cuando se prueba en agar YES para la mayoría de especies conocidas como productoras, mientras que en otras especies, tales como *A. niger*, pocas cepas son productoras. Quizás, por esta razón, en la literatura se encuentran datos confusos o controversiales acerca de la habilidad de producir OTA por algunas especies (Frisvad y col., 2006). Generalmente, una forma de resolver tal problema es determinar todo el perfil de metabolitos secundarios, debido a que varios de ellos, además de la OTA, son producidos más regularmente, de esta forma se podrían diferenciar con mayor certeza las especies del agregado *A. niger* (Frisvad y col., 2007b).

1.2.2.2. Producción de fumonisinas

Las fumonisinas (FBs) son micotoxinas producidas por una gran variedad de especies del género *Fusarium* encontrándose entre las toxinas más importantes con respecto a la alimentación y la seguridad de piensos. Químicamente dichas toxinas son una serie de amino-poliolés de cadena larga (20 carbonos) esterificados en los carbonos 14 y 15 con dos grupos de ácidos tricarbóxicos (Figura 1.3). Hasta la fecha se han propuesto 53 fumonisinas diferentes, aunque las FB₁, FB₂ y FB₃ son consideradas como las más tóxicas dentro de éstas (Gelderblom y col., 1993, Bartók y col., 2006). La IARC clasificó las FBs como un posible carcinógeno humano (IARC 1993) basado en la evidencia epidemiológica que asocia la ingestión de éstas con el cáncer de esófago en la India, China, Brasil y sur de Italia; se ha demostrado también asociación de leucoencefalomalacia en caballos (Marasas y col., 1988) y edema pulmonar en cerdos (Haschek y col., 2001, Bouhet y col., 2006). La FB₁ es la más

estudiada, pero cuando se ha comparado con la fumonisina B₂, esta última es más citotóxica (Gutleb y col., 2002).

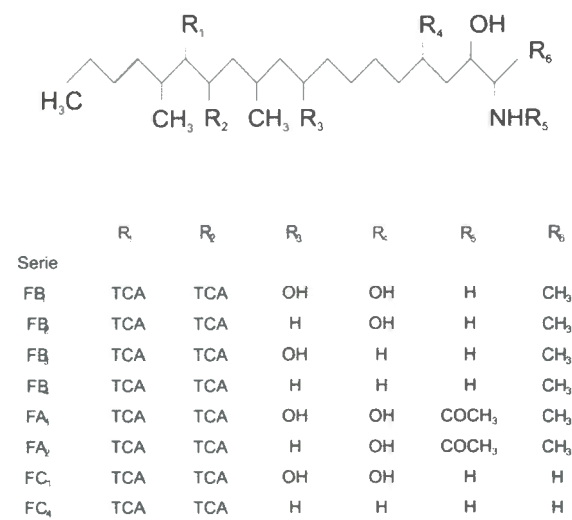


Figura I.4. Estructura química de las fumonisinas

Hasta hace poco, se consideraba que las fumonisinas eran producidas sólo por especies del género *Fusarium*, principalmente por *F. verticillioides*. También se había informado la producción de FB₁ por *Alternaria arborescens* (patógeno de tomate) aunque nunca fue confirmado (Abbas y col., 1996; Mirocha y col., 1996). Proctor y col. (2003) y Brown y col. (2005) caracterizaron el grupo de genes implicados en la formación de FBs en *F. verticillioides* y determinaron que consta de al menos 15 genes diferentes. Recientes informes independientes de Baker y col. (2006) y Pel y col. (2007) mostraron que la especie *A. niger*, muy alejada filogenéticamente de *F. verticillioides*, tiene un grupo de genes hipotéticos para la producción de FBs. La secuenciación completa de los genomas de las cepas de *A. niger* ATCC 1015 y CBS 513.88 coincidieron en que ambas presentan genes homólogos a *F. verticillioides*. Mientras las cepas de *F. verticillioides* producen principalmente FB₁, FB₂ y FB₃, las cepas de *A. niger* sólo FB₂ y FB₄ (Frisvad y col., 2007; Mansson y col., 2010) siendo los mejores medios para la producción CY20S, agar RC (medio a base de maíz y trigo), CYAS con 5% NaCl.

Recientemente varios autores informaron la producción de FBs por *Aspergillus niger* usados en procesos biotecnológicos (Frisvad y col., 2007), cepas aisladas de uvas (Susca y col., 2010; Abrunhosa y col., 2011) y pasas de uvas (Mogensen y col.,

2009; Knudsen y col., 2011). Varios estudios han informado la presencia de fumonisinas en diferentes cultivos y alimentos como arroz (Abbas y col. 1998; Kim y col., 1998), sorgo (Da Silva y col., 2000), frijol mungo (Tseng y col., 1997), espárragos (Logrieco y col., 1998; Liu y col., 2005), té negro (Martins y col., 2001), cereales y piensos (Castellá y col., 1999).

La producción de FBs por cepas de *A. niger* tiene consecuencias graves ya que miembros de esta especie son utilizados en la industria de la biotecnología como productor de enzimas, ácidos orgánicos y fermentación de alimentos. Además esta especie se ha reportado como contaminante en varios alimentos destinados para la alimentación humana y animal.

I.1.3. Identificación mediante criterios basados en el análisis del ADN

Los avances en las técnicas de análisis de ADN han conducido al desarrollo de nuevos métodos para la caracterización y diferenciación de cepas tanto de hongos filamentosos como de otros organismos. La principal ventaja de los métodos de identificación basados en el ADN sobre los métodos de identificación fenotípica es que no están influenciados por las condiciones ambientales (Ness y col., 1993), y no dependen de la interpretación, a veces subjetiva, de características morfológicas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un salto cualitativo en el diagnóstico fúngico. Esta técnica es rápida, específica y fácil de realizar. Además, debido a su alta sensibilidad requiere muy poca cantidad de ADN molde, permitiendo detectar moléculas diana en mezclas complejas. Por ello, está siendo utilizada para la detección y en algunos casos cuantificación directa de especies micotoxicogénicas (Edwards y col., 2002; Russell y Paterson, 2006; Niessen y col., 2007).

La técnica de PCR ha constituido una alternativa muy importante a los antiguos procedimientos moleculares de identificación fúngica, como la electroforesis en gel de campo pulsante (Schwartz y Cantor, 1984), o a los métodos basados en hibridaciones de ADN, como el clásico "Southern Blot" (Southern, 1975) y el "ADN-fingerprinting" (Jeffrey y col., 1985a y b; Lieckfeldt y col., 1992).

Los distintos métodos basados en PCR comúnmente empleados para la identificación de hongos filamentosos incluyen los que se basan en fragmentos polimórficos de restricción y de fragmentos amplificados (RFLPs y AFLPs, respectivamente), en ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs), y en la

amplificación de fragmentos de genes como el factor de elongación 1 α (EF-1 α), la calmodulina, y regiones genómicas no codificantes del ADNr como la región ITS.

Es por esto que para contrarrestar las limitaciones que se presentan al utilizar los criterios morfológicos y bioquímicos, en el estudio de las especies de la sección *Nigri* se han considerado también criterios basados en el análisis del ADN que pueden proporcionar una información más objetiva. Las técnicas moleculares empleadas en dicha sección se han dirigido principalmente a esclarecer tanto la taxonomía de las especies uniseriadas, como a profundizar en el conocimiento de las especies biseriadas, especialmente las especies incluidas en el agregado *A. niger*.

1.1.3.1. Especies uniseriadas

En un primer momento, dentro de las especies uniseriadas se incluían dos especies: *A. japonicus* y *A. aculeatus*, aunque siguiendo ciertos criterios morfológicos se había propuesto una única especie (*A. japonicus*) y dos variedades (*A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus*) (Al-Musallam 1980). Es por ello que, junto a estos criterios se han utilizado diversas técnicas moleculares para lograr clarificar su situación taxonómica. Kusters-van Someren y col. (1991) analizaron los patrones de RFLP del ADN ribosomal (ADNr) obtenidos mediante digestión del ADN total con *Sma*I y observaron que *A. japonicus* y *A. aculeatus* presentaban un perfil idéntico. Otros autores diferenciaron *A. japonicus* y *A. aculeatus* tras el análisis de los patrones de RFLP del ADNr obtenidos con *Eco*RI y con *Pst*I-*Sal*I (Mégnégneau y col., 1993; Visser y col., 1996). Por otro lado, Visser y col., (1996) observaron que la cepa *A. aculeatus* CBS 114.80 (actualmente denominada *A. indologenus*; Jurjevic y col., 2012) mostraba un patrón distinto al resto de las cepas de *A. aculeatus*.

Hamari y col. (1997) no observaron diferencias entre los patrones del ADNr de las dos especies. No obstante, la aplicación de las enzimas de restricción *Bgl*II, *Eco*RI y *Pvu*II en ADN mitocondrial (ADNmt) permitió la obtención de 7 patrones distintos. Estos resultados, juntamente con los criterios fisiológicos estudiados confirmaron la distinción de las dos especies como dos grupos diferenciados.

Parenicova y col. (2000, 2001) distinguieron *A. aculeatus* de *A. japonicus* mediante RFLP y la utilización de diferentes combinaciones de enzimas de restricción. Estos fragmentos fueron hibridados con sondas específicas para la piruvato quinasa (*pk*iA) y la pectina liasa A (*pe*IA) de *A. niger* y los genes 28S ARNr de *Agaricus bisporus*, los que revelaron un polimorfismo claro entre estas dos especies. Las

sondas *pkiA* y *pelA* de *A. niger* ubicaron 6 cepas en el grupo *A. japonicus* y 12 en el grupo *A. aculeatus*, los cuales mostraron variación intraespecífica cuando fueron hibridizados con el gen *pelA*. Estas sondas también podrían ser usadas para distinguir estas especies de otras pertenecientes a la sección (Parenicova y col., 2000), incluyendo *A. vadensis* (de Vries y col., 2005).

La secuencia de un fragmento del gen mitocondrial del citocromo *b* mostró que, tanto *A. japonicus* como *A. aculeatus* presentaban la misma secuencia de aminoácidos, por lo que se consideró que pertenecían a una misma especie (Yokoyama y col., 2001). Sin embargo, Hamari y col. (1997) describieron la incapacidad de transmisión de los genomas mitocondriales entre ambas especies. Por otro lado, Abarca y col. (2004) observaron que los dos taxones uniseriados compartían una secuencia de la región ITS-5.8S del ADNr idéntica, y que por lo tanto, podrían representar una sola especie según este criterio.

Samsom y col. (2004) analizaron la secuencia del gen de la β -tubulina y junto con el perfil de producción de metabolitos secundarios y diferentes criterios morfológicos, incluyeron en la sección *Nigri* a *A. japonicus* y *A. aculeatus* como dos especies distintas.

Recientemente, se ha descrito a *A. uvarum* como perteneciente al grupo de *Aspergillus* sección *Nigri* uniseriados. Morfológicamente esta especie está más estrechamente relacionada a *A. japonicus*. Sin embargo, su velocidad de crecimiento, particularmente en CYA a 37° C, la separa claramente de *A. japonicus* y *A. aculeatus*. Aunque el análisis de la secuencia ITS colocan a todas las especies uniseriadas en el mismo grupo, la secuenciación de los genes de la β -tubulina y calmodulina identifican 3 taxas estrechamente relacionadas: *A. japonicus*, *A. aculeatus* y *A. uvarum* (Perrone y col., 2008).

Con la implementación de estudios polifásicos de clasificación, entre ellos análisis de secuencias conservadas, en los últimos años se describieron nuevas especies uniseriadas: *A. aculeatinus* (Noonim y col., 2008); *A. saccharolyticus* (Sørensen y col., 2011); *A. fijiensis*, *A. indologenus*, (Varga y col., 2011); *A. floridensis* y *A. trinidadensis* (Jurjević y col., 2012).

I.1.3.2. Especies biseriadas

I.1.3.2.a. Serie *Carbonaria*

Las características morfológicas de *A. carbonarius* hacen que sea una especie dentro de la sección *Nigri* claramente diferenciada del resto y, diversas técnicas moleculares también han demostrado esta diferenciación (Abarca y col., 2004).

Al analizar la variabilidad intraespecífica de diversas cepas de *A. carbonarius* mediante análisis de RFLP del ADNr y del ADNmt y análisis de RAPD se observaron patrones muy similares entre las diferentes cepas, aunque con ligeras variaciones (Kevei y col., 1996). Sólo una cepa (IN7) presentó perfiles de restricción del ADNr y ADNmt y patrones de RAPD diferentes al resto, al igual que diversos caracteres morfológicos y fenotípicos distintivos. Los mapas físicos del ADNmt de la cepa IN7 mostraron diferencias en el tamaño del ADNmt en comparación con otras cepas de *A. carbonarius*, aunque el contenido genético era casi idéntico (Hamari y col., 1999). Más tarde, la cepa *A. carbonarius* IN7 fue descrita como *A. brasiliensis* (Varga y col., 2007).

El análisis filogenético de la región ITS-5,8S de las especies de esta sección reveló que *A. carbonarius* se diferenciaba claramente del resto de especies evaluadas. *Aspergillus carbonarius* forma un grupo separado dentro de las especies biseriadas (Parenicová y col., 2000, 2001; Abarca y col., 2004). Resultados similares se observaron al analizar las regiones D1 y D2 de la unidad 28S del ADNr (Peterson 2000).

Bau y col. (2005) y Serra y col. (2005) detectaron cepas inicialmente identificadas como *A. carbonarius* aisladas en la Península Ibérica, que no producían OTA y presentaban conidios de un diámetro inferior al característico de esta especie. Además se diferenciaban del resto de cepas de *A. carbonarius* mediante análisis de RAPD y secuenciación de la región ITS-5,8S del ADNr (Bau y col., 2005). Estas diferencias fueron confirmadas mediante marcadores AFLP y secuenciación del gen de la calmodulina, por lo que se describió como una nueva especie dentro de la sección *Nigri*, denominada *A. ibericus* (Serra y col., 2006).

Dos nuevas especies dentro de la Serie Carbonaria fueron identificadas como *Aspergillus sclerotioniger* (Samson y col., 2004) y *Aspergillus sclerotiicarbonarius* (Noonim y col., 2008) aisladas de granos de café. *Aspergillus sclerotioniger* produce grandes esclerocios color amarillo a marrón rojizo y abundante cantidad de OTA.

Dicha especie se agrupa junto con *A. carbonarius* mediante análisis de la secuencia del gen de la β -tubulina formando un grupo hermano de las principales especies del agregado *A. niger* (100% de soporte) (Samson y col., 2004). Posteriormente, Noonim y col. (2008) describieron a *A. sclerotii carbonarius* una especie biseriada, similar a *A. carbonarius* y *A. ibericus*, productora de abundantes esclerocios y algunos indolalcaloides únicos. Ésta especie produce esclerocios similares cuando se compara con *A. sclerotioniger*, y se distinguen por el color del micelio (*A. sclerotioniger* amarillo y *A. sclerotii carbonarius* blanco). La ornamentación de conidios de *A. sclerotii carbonarius* presenta mayor similitud a la de la especie recientemente descrita, *A. ibericus* (Serra y col., 2006) que a *A. carbonarius*. Basándose en el análisis filogenético de los datos de secuencia para tres loci (ITS; calmodulina; β -tubulina), *A. sclerotii carbonarius* forma un grupo hermano junto con *A. ibericus* (100% de soporte) de *A. carbonarius* y *A. sclerotioniger*, coincidiendo la monofilia del grupo con la capacidad de producir o no OTA.

Schmidt y col. (2004) desarrollaron *cebadores* específicos de especies en base a fragmentos obtenidos a través de marcadores AFLP para la identificación de *A. carbonarius* en granos de café, mientras que, Atoui y col. (2007) y Mule y col. (2006) desarrollaron un sistema de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *A. carbonarius* en uvas. Estos dos últimos grupos utilizaron *cebadores* específicos diseñados a partir del dominio de la aciltransferasa (AT) de la secuencia de la policétido sintetasa (PKS) y el gen de la calmodulina, respectivamente. Susca y col. (2007a) también desarrollaron *cebadores* específicos basados en la secuencia parcial del gen de la calmodulina para identificar *A. carbonarius* y *A. niger* por PCR.

I.1.3.2.b Agregado *A. niger*

Se han utilizado diversas técnicas moleculares con el fin de clarificar la taxonomía de los miembros de este agregado ya que morfológicamente las especies que lo componen se distinguen por diferencias muy sutiles (Abarca y col., 2004).

Kusters-van Someren y col. (1990) mediante *Southern blot* utilizando el gen *pefD* como sonda y *Western blot* del gen pectina liasa no pudieron diferenciar las especies incluidas dentro del agregado *A. niger*. Como una continuación de este trabajo, Kusters-van Someren y col. (1991) observaron dos patrones de RFLP del ADNr al realizar la digestión con *SmaI* en cepas del agregado *A. niger*. Debido a que el cultivo neotipo de *A. niger* (CBS 554.65) pertenecía al grupo I y el cultivo tipo de *A.*

tubingensis (CBS 134.48) al grupo II, propusieron denominar a las cepas del grupo I como *A. niger* y a las del grupo II como *A. tubingensis*. Estos dos grupos eran morfológicamente idénticos. Luego, Mégnégneau y col. (1993) confirmaron estos resultados mediante el análisis de RFLP del ADN total con *Sma*I, *Eco*RI y *Pst*I en cepas de colección.

Una amplia variación de ADNmt también se ha observado tanto entre las cepas de colección como en poblaciones naturales del agregado *A. niger* (Varga y col., 1993, 1994). Dentro del agregado *A. niger*, la mayoría de las cepas fueron clasificados como *A. niger* o *A. tubingensis* de acuerdo con sus patrones de digestión con *Hae*III-*Bgl*II del ADNmt. Además, se observó un tercer patrón de RFLP en 6 cepas aisladas de suelo de Brasil que no se distinguían morfológicamente de las cepas agrupadas como *A. niger* o *A. tubingensis*. Estos autores propusieron que las cepas pertenecientes a este tercer patrón representarían una subespecie de *A. niger* o una nueva especie del agregado *A. niger*. Más tarde, esta especie fue nominada *A. brasiliensis* (Varga y col., 2007) en base a la secuenciación del gen de la calmodulina. La división del agregado *A. niger* en los grupos *A. niger* y *A. tubingensis* fue confirmado nuevamente por Visser y col. (1996) mediante la utilización de diferentes enzimas de restricción y la hibridación con diferentes sondas.

Parenicová y col. (1997, 2000) en un estudio con 23 cepas de colección del agregado *A. niger*, describieron un nuevo patrón de RFLP del ADNr obtenido con *Pst*I-*Sal*I representado por las cepas de *A. foetidus*. Como consecuencia de ello propusieron la división del agregado en tres taxones morfológicamente idénticos: *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. foetidus*. En un trabajo posterior (Parenicová y col., 2001), se propuso la división del agregado en 4 especies morfológicamente idénticas: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis*. Esta división se propuso tras considerar los patrones de restricción obtenidos con las enzimas *Kpn*I-*Xho*I y *Pst*I-*Sal*I. No obstante, al realizar la digestión del ADN con *Pst*I-*Sal*I y la hibridación con el gen 28S del ADNr, que posteriormente había permitido separar cepas de *A. foetidus* del resto de especies del agregado (Parenicová y col., 1997), *A. niger* y *A. tubingensis* compartían el mismo patrón de ADNr (Parenicová y col., 2001).

El análisis de las regiones ITS-5,8S del ADNr de las cepas de la sección *Nigri* incluidas en otro estudio (Parenicová y col., 2000) permitió determinar que las diferencias entre las 4 especies mencionadas anteriormente (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis*) eran mínimas (entre 2 y 5 nucleótidos). Los árboles filogenéticos obtenidos del análisis de estas regiones del ADN realizadas por



diferentes autores (Parenicová y col., 2001; Abarca y col., 2004) muestran las cepas del agregado *A. niger* claramente diferenciadas del resto de cepas de la sección *Nigri*. En el agregado se agrupan conjuntamente los 4 grupos propuestos: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis*. No obstante, las cepas representativas de *A. tubingensis* y *A. foetidus* se agrupan juntas en un subgrupo y la secuencia de *A. brasiliensis* es la menos similar dentro del agregado. Al realizar la secuenciación de las regiones D1 y D2 de la unidad 28S del ADNr las especies pertenecientes al agregado se diferencian del resto de especies de la sección aunque dentro del agregado no se observa una variabilidad remarcable (Peterson 2000).

Accensi y col. (1999) mediante RFLP-PCR utilizaron la enzima de restricción *Rsal* para digerir la región ITS-5,8S amplificada, y observaron que cepas del agregado *A. niger* presentaban dos patrones diferentes de RFLP: el patrón denominado N (2 fragmentos, 519 y 76 pb) y el patrón T (un fragmento de 595 pb) que correspondían a las cepas *A. niger* y *A. tubingensis*, respectivamente. En este estudio se evaluó una cepa de *A. brasiliensis* y se clasificó como tipo N. La cepa tipo de *A. foetidus* var. *acidus* (CBS 564.65) incluida en el grupo *A. foetidus* por Parenicová y col. (1997, 2001) se clasificaría como tipo T. La simplicidad de esta técnica permite fácilmente la detección de los patrones N y T, sin embargo, un examen *in silico* de la región ITS de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* indica que el patrón T también es compartido por cepas de *A. foetidus*, *A. vadensis*, *A. piperis* y *A. costaricensis*, mientras que todas las demás especies presentan patrón de N. Sin embargo, este método ha sido utilizado para distinguir las especies de *A. niger* de *A. tubingensis* (Accensi y col., 2001; Medina y col., 2005; Bau y col., 2006; Martínez-Culebras & Ramon 2007). En un estudio posterior, Accensi y col. (2001) pusieron de manifiesto que todas las cepas productoras de OTA estudiadas tenían un patrón de RFLP tipo N. Este hecho ha sido corroborado en estudios posteriores en los que se han estudiado los patrones de RFLP de alrededor de 200 cepas del agregado *A. niger* de diferentes orígenes, incluyendo también cepas de colecciones (Cabañés y col., 2002; Abarca y col., 2003; Leong y col., 2004). No obstante, recientemente se ha descrito la producción de OTA por 3 cepas aisladas de uvas que han presentado un patrón T (Medina y col., 2005). Igualmente esto sigue siendo cuestionado ya que Sartori y col. (2012) demostraron que algunos aislados de *A. tubingensis* que habían sido considerados productores, debido a un error de detección, utilizando HPLC MS/MS consideraron que dicha especie no es productora de OTA.

Recientemente, Susca y col. (2007b) mediante *PCR-single-stranded conformational polymorphism* (SSCP) basado en la detección de variaciones de la secuencia del gen calmodulina, pudieron distinguir 11 especies (*A. brasiliensis*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. aculeatus*, *A. uvarum*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. carbonarius* y *A. ibericus*) en base a los diferentes perfiles PCR-SSCP. Actualmente, los métodos de identificación basados en secuencias son ampliamente utilizados para la identificación de especies. Todas las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* se pueden distinguir unas de otras usando la secuencia de la calmodulina, y todas, excepto *A. lacticoffeatus* se pueden distinguir usando la secuencia de β -tubulina (*A. lacticoffeatus* tiene idéntica secuencia de β -tubulina a algunas cepas de *A. niger*, Samson y col., 2004; Varga y col., 2007).

Los datos obtenidos a partir de la secuencia de la región ITS pueden distinguir 4 grupos dentro del agregado *A. niger*: 1. *A. niger* y *A. lacticoffeatus*; 2. *A. brasiliensis*; 3. *A. costaricensis*; 4. *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. vandensis* y *A. piperis* (Varga y col., 2007).

Debido a que *A. tubingensis* y *A. niger*, junto con *A. carbonarius*, son informados como productores de OTA, su correcta identificación dentro de las especies del agregado *A. niger* es muy importante a fin de evitar una sobreestimación de los riesgos de contaminación y toxicológicos (Medina y col., 2005; Perrone y col., 2006a). Como se ha mencionado anteriormente, diversos estudios moleculares han reducido el número de especies y soportan la división de este agregado en 2 a 4 especies morfológicamente indistinguibles: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis* (Kusters van Someren y col., 1991; Accensi y col., 1999; Parenicova y col., 2000; Abarca y col., 2004). Estas 4 especies son muy difíciles de diferenciar por criterios morfológicos tales como, forma, tamaño y color de los conidios (Samson y col., 2004). Sin embargo, la efectividad en la estimación de la contaminación por OTA depende de la asociación entre las especies y la producción de OTA, por lo que, el uso de cebadores específicos de especies diseñados a partir de los genes involucrados en la biosíntesis de OTA podrían ser de utilidad. Aunque, recientemente se han diseñados cebadores que permiten la identificación de cepas productoras (Dao y col., 2005), los genes involucrados en la síntesis de dicha micotoxina aún no han sido identificados. La identificación y detección de especies por métodos basados en PCR podría ser una herramienta útil para identificar y detectar especies de *Aspergillus* potencialmente ocratoxicogénicas. Perrone y col. (2004) y Susca y col. (2007a) desarrollaron cebadores específicos para detectar *A. carbonarius* y *A. japonicus/A. aculeatus*, y *A.*

tubingensis y *A. niger*, respectivamente. Dichos cebadores serían de utilidad para predecir los riesgos de contaminación por OTA en uvas y productos derivados.

Recientemente, se ha descrito que *A. niger* contiene la especie filogenéticamente críptica *A. awamori* (= *A. welwitschiae*) (Perrone y col., 2011). Estas especies no pueden distinguirse usando caracteres morfológicos o producción de extrolitos. Sin embargo, datos moleculares incluyendo secuenciación del gen de la β -tubulina, calmodulina o factor de elongación pueden distinguir estas dos especies (Perrone y col., 2011).

Con la implementación de estudios polifásicos de clasificación, entre ellos análisis de secuencias conservadas, en los últimos años se describieron nuevas especies pertenecientes al agregado *A. niger* y se reclasificaron otras como: *A. neoniger*, *A. eucalypticola*, *A. niger* (= *A. foetidus*=*A. lacticoffeatus*) y *A. acidus* (anteriormente clasificado como *A. foetidus* var. *acidus*) (= *A. coreanus*) (Varga y col., 2011); *A. luchuensis* (= *A. kawachii* = *A. acidus* = *A. coreanus*) y *A. welwitschiae* (= *A. awamori*) (Hong y col. 2013).

Las diferentes técnicas moleculares aplicadas para la delimitación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* se resumen en Tabla I.4.

Tabla I.4. Herramientas moleculares aplicadas para la identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*

Método usado	Región génica	Referencia	Comentarios
RFLP	<i>pelA</i> , <i>pelB</i> , <i>pki</i>	Kusters-van Someren y col. (1991)	Distinción entre <i>A. niger</i> y <i>A. tubingensis</i>
RFLP	ADNr (<i>SmaI</i>)	Kusters-van Someren y col. (1991); Varga y col. (2000)	Distinción entre <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. brasiliensis</i> , <i>A. ellipticus</i> , <i>A. heteromorphus</i> , <i>A. japonicus</i> y <i>A. carbonarius</i>
RFLP	ADNmt (<i>HaeIII</i> – <i>BglIII</i>)	Varga y col. (1993, 1994); Hamari y col. (1997)	Distinción de <i>A. niger</i> y <i>A. brasiliensis</i> de <i>A. tubingensis</i> , y <i>A. japonicus</i> de <i>A. aculeatus</i> .
RFLP	<i>pelA</i> , <i>pki</i> , ADNr	Parenicová y col. (2001); de Vries y col. (2005)	Distinción de la mayoría de las especies incluyendo <i>A. japonicus</i> , <i>A. aculeatus</i> y <i>A. vadensis</i>
RFLP-PCR	ITS (<i>RsaI</i>)	Accensi y col. (1999, 2001); Medina y col. (2005); Bau y col. (2005)	Tipos N y T distinguidos entre las especies del agregado <i>A. niger</i>
RFLP-PCR	ITS (<i>RsaI</i> , <i>HhaI</i> , <i>NlaIII</i>)	Martínez-Culebras & Ramon (2007)	Distinción entre <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>A. aculeatus</i>
RFLP-PCR	ITS (<i>RsaI</i>), IGS (<i>HinfI</i>), β -tubulina	Zanzotto y col. (2006)	Distinción entre cepas productoras y no productoras de OTA del agregado <i>A. niger</i>
AFLP		Perrone y col. (2006a, 2006b)	Distinción de todas las especies conocidas
SSCP-PCR	calmodulina	Susca y col. (2007b)	Distinción de 11 especies incluyendo <i>A. brasiliensis</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. uvarum</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. ellipticus</i> , <i>A. heteromorphus</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>A. ibericus</i>
OLISA	calmodulina	Buffier y col. (2007)	Distinción entre <i>A. carbonarius</i> , <i>A. ibericus</i> y <i>A. japonicus/A. aculeatus</i>

Tabla I.4. Continuación

Secuencias	ITS	Varga y col. (2007)	Identificación de varias especies (<i>A. niger</i> y <i>A. lacticoffeatus</i> ; <i>A. tubingensis</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. vadensis</i> y <i>A. piperis</i> ; <i>A. carbonarius</i> y <i>A. sclerotioniger</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. aculeatus</i> y <i>A. uvarum</i>)
Secuencias	Citocromo <i>b</i> mitocondrial	Yokoyama y col. (2001)	Distinción de <i>A. japonicus</i> / <i>A. aculeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>A. ellipticus</i>
Secuencias	β -tubulina	Samson y col. (2004); Varga y col. (2007)	Distinción de todas excepto <i>A. lacticoffeatus</i>
Secuencias	calmodulina	Varga y col. (2007)	Distinción de todas las especies conocidas
Secuencias	IGS	Dato no publicado	Muy variable para la identificación de especies
Cebadores específicos	ITS	Gonzalez-Salgado y col. (2005)	Detección específica de <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. ellipticus</i> , <i>A. japonicus</i>
Cebadores específicos	calmodulina	Susca y col. (2007a)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i> y <i>A. niger</i>
Cebadores específicos	fragmento de RAPD	Fungaro y col. (2004)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i>
Cebadores específicos	calmodulina	Perrone y col. (2004)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i> y <i>A. japonicus</i>
Cebadores específicos	ITS	Haugland & Vesper (2002)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i> y <i>A. niger</i>
Cebadores específicos	Marcador AFLP	Schmidt y col. (2004)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i>
Cebadores específicos	PKS	Dobson & O'Callaghan (2004)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i> y <i>A. niger</i>
PCR Tiempo Real	ITS	Haugland y col. (2004)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i> y <i>A. niger</i>
	calmodulina	Mulé y col. (2006)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i>
	Dominio AT del gen PKS	Atoui y col. (2007)	Detección específica de <i>A. carbonarius</i>
Secuencias	Calmodulina, β -tubulina, ITS	Varga y col. (2011); Noonim y col. (2008); Sørensen y col. (2011); Varga y col. (2011); Jurjević y col. (2012); Hong y col. (2013)	Identificación de <i>A. neoniger</i> , <i>A. eucalypticola</i> , <i>A. aculeatinus</i> , <i>A. sclerotii carbonarius</i> , <i>A. saccharolyticus</i> , <i>A. fijiensis</i> , <i>A. indologenus</i> , <i>A. niger</i> (= <i>A. foetidus</i> = <i>A. lacticoffeatus</i>), <i>A. floridensis</i> , <i>A. trinidadensis</i> , <i>A. luchuensis</i> (= <i>A. kawachii</i> = <i>A. acidus</i>) y <i>A. welwitschiae</i> (= <i>A. awamori</i>)

I.1.4. Marcadores moleculares

Es bien sabido que varios marcadores moleculares se han utilizado para distinguir las especies de *Aspergillus* negros y evaluar su diversidad genética. Al respecto, se han utilizado RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos) del ADN tanto nuclear como mitocondrial, RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar), PCR-RFLP y, AFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados) (Perrone y col., 2007; Samson y col., 2007; Chiotta y col., 2010), entre otros. Además, se han utilizado secuencias conservadas, tales como, región ITS e IGS del ADNr, genes de la β -tubulina, calmodulina, citocromo b, entre otras, a fin de delimitar las especies pertenecientes a dicha sección (Perrone y col., 2007, Samson y col., 2007; Chiotta y col., 2011).

Entre los marcadores moleculares, los ISSRs (Secuencias Intergénicas Simples Repetidas) permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsátélites que se encuentran dispersas en el genoma. Dichas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT) $_n$ ó (CA) $_n$, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de "anclas" asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsátélite, respectivamente (Zietkiewicz y col., 1994; Bornet y col., 2001; Pradeep y col., 2002). Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las condiciones astringentes de la reacción. Por otro lado, para diseñar los cebadores ISSR no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio y pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida. Finalmente, son sencillos, rápidos, eficientes y poco costosos (Bornet y col., 2001).

Los marcadores ISSRs han sido utilizados para la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones en varias especies fúngicas toxicogénicas, entre ellas, especies de *Aspergillus* (Batista y col., 2008; Martínez-Culebras y col., 2009; Neal y col., 2011) y *Fusarium* (Mishra y col., 2003; 2004; Dinolfo y col., 2010).

Estos marcadores moleculares neutros pueden ser utilizados también, para desarrollar cebadores específicos generando productos de amplificación únicos que permitan diferenciar especies estrechamente relacionadas a través de un conjunto de

regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCAR). Ésta metodología ha sido ampliamente utilizada en la identificación de varias especies de plantas (Choi y col., 2008; Devaiah y Venkatasubramanian 2008 a, b; Dhanya y col., 2009; Ladhalakshmi y col., 2009; Ray & Roy 2009), patotipos (Chen y col., 2010), en la detección específica de *Aspergillus flavus* (Devi y col., 2013), en la discriminación de *Artemisia princeps* y *A. argyi* de otras hierbas Artemisia (Hayashi y col., 2011), en la identificación de diferentes formas especiales y razas de *F. oxysporum* (Ciocchetti y col., 2001; Alves-Santos y col., 2002; Jiménez-Gasco y col., 2001, 2003), así como también en la determinación del sexo (Kim y col., 2008), en el mapeo molecular de genes para la resistencia a insectos de la vaina del frijol común (Blair y col., 2006) y en el desarrollo de marcadores vinculados con el marchitamiento por *Fusarium* en berenjena (Mutlu y col., 2008), entre otros.

II. Hipótesis
III. Objetivos

II. HIPOTESIS:

Existe una gran biodiversidad dentro de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* que contaminan productos agrícolas, con nuevas especies que aún no han sido descritas porque no se han utilizado en forma sistemática las herramientas necesarias (caracterización morfológica, perfil de producción de extrolitos, secuenciación de ADN) para la definición de especie dentro del género.

III.1. OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar las poblaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes productos de interés agrícola de Argentina a través de un estudio polifásico, incluyendo datos morfológicos, fisiológicos, ecológicos y moleculares

III.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes productos de interés agrícola de Argentina en base a características morfológicas.
2. Identificar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* a través de reacciones de PCR usando cebadores específicos.
3. Obtener el perfil de producción de extrolitos de dichas cepas.
4. Estudiar las relaciones filogenéticas de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en base a la secuencia del gen de la calmodulina.
5. Evaluar la diversidad genética de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* a través del uso de marcadores neutros (ISSRs).
6. Diseñar cebadores específicos de especie a partir del perfil de ISSRs.
7. Analizar el grado de correlación de las características macro y micromorfológicas, producción de extrolitos y caracterización molecular.

IV. Materiales y Métodos

IV. MATERIALES Y METODOS

IV.1. Cepas

Se analizaron 194 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*, alguna de las cuales fueron seleccionadas al azar de la colección de *Aspergillus* del laboratorio de Micología (Universidad Nacional de Río Cuarto) y otras fueron aisladas de diferentes sustratos: maní, pasas de uvas, pimienta, almendra y soja (Anexo VIII.1).

Además se evaluaron cepas de referencia identificadas como: *Aspergillus japonicus* ITEM 7034; *Aspergillus aculeatus* ITEM 7046; *Aspergillus uvarum* ITEM 4834; *Aspergillus niger* FRR 5695; *A. niger* ITEM 4501; *A. niger* FRR 5722; *Aspergillus lacticofeatus* ITEM 7559; *Aspergillus welwitchiae* FRR 5804; *Aspergillus welwitchiae* ITEM 4502; *Aspergillus welwitchiae* ITEM 4509; *Aspergillus tubingensis* ITEM 4845; *A. tubingensis* FRR 5720, *Aspergillus vadensis* ITEM 7561; *Aspergillus carbonarius* FRR 5690; *A. carbonarius* A2034; *Aspergillus ibericus* ITEM 4776; *Aspergillus sclerotioniger* ITEM 7560; *Aspergillus homomorfus* ITEM 7556; *Aspergillus ellipticus* ITEM 4505, gentilmente cedidas por Dr. G. Perrone del Institute of Sciences of Food Production, CNR (Bari, Italia). Las diferentes cepas se encuentran liofilizadas y/o mantenidas en una solución de glicerol al 15% a -80° C a fin de evitar mutaciones o cambios en las características de las mismas.

IV.2. Identificación mediante caracteres morfológicos

IV.2.1. Medios de cultivo

-*Agar extracto de malta* (MEA): Extracto de malta (Britania) 20 g, Peptona de soja (Britania) 1 g, Glucosa (Cicarelli, p.a.) 20 g, Agar-agar (Britania) 20 g, Agua destilada csp. 1000 ml.

-*Czapek concentrado*: NaNO_3 (Cicarelli, p.a.) 30 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Cicarelli, p.a.) 5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) 5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt, p.a.) 0,1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Cicarelli, p.a.) 0,05 g, Agua destilada csp. 1000 ml.

-*Agar Czapek – extracto de levadura (CYA)*: K_2PO_4H (Cicarelli, p.a.) 1 g, Czapek concentrado 10 ml, Extracto de levadura (Merck) 5 g, Sacarosa (Cicarelli, p.a.) 30 g, Agar-agar (Britania) 15 g, Agua destilada csp. 1000 ml.

-*Agar Czapek – extracto de levadura con 20% de sacarosa (CY20S)*: K_2PO_4H (Cicarelli, p.a.) 1 g, Czapek concentrado 10 ml, Extracto de levadura (Merck) 5 g, Sacarosa (Cicarelli, p.a.) 200 g, Agar-agar (Britania) 15 g, Agua destilada csp. 1000 ml.

-*Agar Diclorán-Rosa de Bengala-Cloranfenicol (DRBC)*: Peptona 5 g, Glucosa 10 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 g, KPO_4H_2 1 g, Diclorán 0,002 g, Rosa de bengala 0,0025 g, Agar-agar 15 g, Agua destilada csp. 1000 mL.

-*Diclorán 18% Glicerol Agar (DG18)*: Glucosa 10 g, Peptona 5 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 g, KPO_4H_2 1 g, Diclorán (Fluka) 0,002 g, Cloranfenicol 0,001 g, Glicerol 220 g, Agar-agar 15 g, Agua destilada csp. 1000 mL.

-*Agar creatina sacarosa (CREA)*: Concentrado CS 10 mL, Sacarosa 10 g, Creatina 5 g, K_2PO_4H 1 g, Púrpura de bromocresol 0,05 g, Agar-agar 15 g, Agua destilada csp. 1000 mL.

Cada uno de los medios de cultivo anteriormente descritos se esterilizaron en autoclave a 121° C por 15 minutos.

IV.2.2. Metodología

Para las observaciones macromorfológicas se utilizaron los medios de cultivo: agar extracto de malta (MEA), agar Czapek extracto de levadura (CYA), Agar Czapek extracto de levadura con 20% de Sacarosa (CY20S) y agar Czapek Dox (CZ) siguiendo la clave taxonómica de Klich (2002). Los cultivos fueron inoculados en tres puntos equidistantes entre sí, del borde y del centro de la placa e incubados a 25° C en la oscuridad. Todas las placas se observaron macroscópicamente y microscópicamente después de un periodo de 7 días de incubación. Las cepas también fueron inoculadas en agar creatina sacarosa (CREA) y CYA a 37° C (Frisvad & Samson 2004).

IV.3. Identificación mediante métodos moleculares basados en PCR

IV.3.1. Cepas

Todas las cepas identificadas en el presente estudio como *Aspergillus* sección *Nigri* por metodología clásica, se identificaron por métodos moleculares utilizando cebadores específicos de especie.

IV.3.2. Producción de la biomasa fúngica

Se realizó una suspensión de esporas de cada cepa desarrollada en MEA y se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio Wikerham (Glucosa 40 g, Peptona 5 g, Extracto de levadura 3 g, Extracto de malta 3 g, agua destilada csp. 1000 ml) (Mulé y col., 2006). Los cultivos se incubaron a 25° C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm). El micelio se cosechó por filtración usando vacío, el mismo se lavó con agua estéril y posteriormente se secó con papel absorbente, todo bajo flujo laminar. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

IV.3.3. Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

IV.3.3.1. Materiales

- Buffer CTAB al 2%: 2% CTAB (Sigma), 100 mM Tris-ClH (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl.
- 2-mercaptoetanol (Merk).
- Buffer TE 1x: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8
- Solución de cloroformo-isoamilalcohol (24:1, v/v) (Biopack).
- Isopropanol (2-propanol) (Sintorgan).
- Acetato de amonio 7,5 M (Cicarelli).
- Etanol al 70% (Biopack).
- Bromuro de etidio: solución stock 10 mg/ml (Promega).
- Buffer TAE (50X): 242 g Tris base (Promega); 57,1 ml ácido acético glacial (Biopack); 0,5 M EDTA (pH 8) (Promega).

IV.3.3.2 Metodología

El micelio congelado se pulverizó completamente sobre morteros utilizando nitrógeno líquido, luego se distribuyó en microtubos de 1,5 ml estériles y se almacenaron a -20°C . La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología propuesta por Leslie & Summerell (2006) con algunas modificaciones. Para ello, al micelio congelado se le adicionó 750 μl de CTAB al 2% (calentado previamente a 65°C) y 15 μl de 2-mercaptoetanol, se agitó durante 2 min en agitador y se incubó posteriormente a 65°C durante 15 min. Luego del tiempo de incubación los tubos fueron nuevamente agitados por 2 min e incubados a 65°C durante 15 min. Se agregó 500 μl de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 1 min y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Se tomó aproximadamente 600 μl de la fase acuosa y se la transfirió a un microtubo estéril, se agregó igual volumen de isopropanol y mitad del volumen de acetato de amonio 7,5 M, mezclando por inversión. Luego se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El residuo se lavó 2 veces con 500 μl de etanol frío al 70% (v/v) y se secó a temperatura ambiente durante 2 a 3 min invirtiendo los tubos sobre papel absorbente. Por último, los residuos se resuspendieron en 100 μl de buffer TE 1X.

El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago lambda digerido con *HindIII* como ADN testigo teñidos con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras de ADN fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 – 1%. Se realizaron las diluciones correspondientes en agua bidestilada calidad biología molecular hasta obtener una concentración aproximada de 10–20 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

IV.3.4. Reacciones de PCR

IV.3.4.1. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3; 1,5 mM MgCl_2), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,1 μM de cada cebador (TUB1/TUB2; NIG1/NIG2), y 1 μl de ADN templado (aproximadamente 10 ng); en un volumen final de 10 μl .

Mezcla de reacción de PCR optimizadas (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3; 1,5 mM MgCl₂), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,5 μM de cada cebador (JAPO1/JAPO2; CARBO1/CARBO2), y 1 μl de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 10 μl.

Programa de PCR (cebador TUB1/TUB2 y NIG1/NIG2): 1 ciclo a 94° C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94° C por 50 s, 60° C por 50 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

Programa de PCR (cebador JAPO1/JAPO2; CARBO1/CARBO2): 1 ciclo a 94° C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94° C por 50 s, 58° C por 50 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

IV.3.4.2. Metodología

Se utilizaron las condiciones de amplificación descritas en el **punto IV.3.4.1** para cada par de cebador que permitirían identificar a *Aspergillus* sección *Nigri* uniseriados (*A. aculeatus/A. japonicus*), biseriados (*A. niger* y *A. tubingensis*) y *A. carbonarius* (Tabla IV.1). Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento. También se incluyeron controles positivos en cada prueba dependiendo del cebador utilizado: *A. japonicus* ITEM 7034, *A. aculeatus* ITEM 7046, *A. uvarum* ITEM 4834, *A. niger* FRR 5722, *A. tubingensis* ITEM 4845, y *A. carbonarius* FRR 5690.

La amplificación se realizó en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las condiciones descritas en el **punto IV.3.4.1**. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μg/ml) y se visualizaron con un digitalizador MiniBis Pro (DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100–2072 pb.

Tabla IV.1. Secuencia de los cebadores y tamaño de los productos de amplificación utilizados para distinguir las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Especie	Cebadores (5' – 3')	Producto de amplificación
<i>A. japonicus/A. aculeatus</i> ^a	JAPO1: TTACTGATTCATTTCTCGTGATYCCT	583pb
	JAPO2: TCAAGCAGGGAATGTGTGGA	
<i>A. carbonarius</i> ^a	CARBO1: AAGCGAATCGATAGTCCACAAGAATAC	371pb
	CARBO2: TCTGGCAGAAGTTAATATCCGGTT	
<i>A. niger</i> ^d	NIG1: GATTCGACAGCATTT(CT/TC)CAGAA	245pb
	NIG2: AAAGTCAATCACAATCCAGCCC	
<i>A. tubingensis</i> ^d	TUB1: TCGACAGCTATTTCCCCCTT	505pb
	TUB2: TAGCATGTCATATCACGGGCAT	

^a Perrone y col. (2004); ^d Susca y col. (2007a)

IV.4. Producción de metabolitos secundarios

IV.4.1. Materiales

- Soluciones testigos de ocratoxina A: A partir de la toxina pura (ocratoxina A-Sigma Aldrich, Co) se prepararon en metanol las soluciones de trabajo en concentraciones de 34 ng/ml, 54 ng/ml, 68 ng/ml y 136 ng/ml.
- Para la extracción de OTA y como solvente para el desarrollo de la cromatografía se utilizaron los siguientes solventes y mezclas: Cloroformo p. a. (Merck N 2445); acetonitrilo: agua: ácido acético (99:99:2, v/v/v).
- Soluciones testigos de fumonisina B₂: a partir de la toxina pura (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.) se prepararon en acetonitrilo:agua (1:1, v/v) las soluciones de trabajo en concentraciones de 0,6 µg/ml, 1,5 µg/ml, 3 µg/ml.
 - Para la extracción de fumonisina B₂ y como solvente para el desarrollo de la cromatografía se utilizaron los siguientes solventes y mezclas: metanol: agua (75:25, v/v) y una solución de metanol: fosfato monosódico 0,1 M (75:25, v/v).

IV.4.2. Producción de ocratoxina A

Para determinar la capacidad de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* de producir OTA se utilizó la metodología descrita por Teren y col. (1996) con algunas modificaciones.

Para optimizar las condiciones de producción de OTA se utilizaron dos cepas de *A. carbonarius* (B18C, B132C), la cuales fueron desarrolladas en cultivos estacionarios en medio YES en viales de 4 y 10ml (conteniendo 1 y 2 ml, respectivamente), los cuales fueron inoculados con una porción de agar de la cepa desarrollada en MEA e incubada a 7 y 10 días a 30° C en oscuridad. Luego del periodo de incubación, el extracto se filtró a través papel Whatman N°1 con portafiltro, 0,5 ml del filtrado fueron mezclados con 0,5 ml de cloroformo por 1 min y centrifugado a 4000 rpm por 10 min. Se transfirió 0,4 ml de la fase clorofórmica a un tubo limpio, se evaporó a sequedad y se lo mantuvo a -20° C hasta el momento del análisis.

Una vez seleccionada la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4 (Viales de 4 ml conteniendo 1 ml de YES) se procedió a la optimización de la producción de OTA a diferentes temperaturas (15, 25, 30 y 35°C) y tiempos (7 y 10 días) por duplicado utilizando las 19 cepas de referencia evaluadas en el presente estudio.

Luego se determinó la capacidad de producir OTA en la relación Vol. Medio/ Vol. Recipiente 1/4 de 52 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* seleccionadas al azar provenientes de diferentes sustratos y diferentes regiones geográficas, a 25 y 30° C durante 7 y 10 días por duplicado.

A las cepas restantes, se les determinó la producción OTA en la condición 25°C durante 7 días en la relación 1/4 de Vol. Medio/Vol. Recipiente.

La detección y cuantificación de OTA a partir de los extractos secos se realizó utilizando un sistema de detección con fluorescencia por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) Hewlett Packard Serie 1100. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µL de tamaño de partícula; Phenomenex, Luna), conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 µL de tamaño de partícula, Supelco). La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo: agua: ácido acético (99:99:2, v/v/v) a un flujo de 1 ml/min. La fluorescencia de la OTA fue registrada a una longitud de onda de 330 excitación y 460 de emisión. El tiempo de retención de dicha micotoxina fue de aproximadamente 5,7 - 5,9 minutos.

Las soluciones testigos fueron preparadas disolviendo OTA pura (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO USA, pureza>99%) en metanol grado HPLC. La cuantificación de OTA se realizó por medición de la altura de los picos y su extrapolación a una curva de calibración realizada con distintas concentraciones de las soluciones testigos de OTA (34 ng/ml, 54 ng/ml, 68 ng/ml y 136 ng/ml). El límite de detección de OTA fue 20 ng/ml.

IV.4.3. Análisis estadístico

Para la determinar las variaciones de producción de OTA de las cepas ensayadas, se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba de comparación múltiple (Método de Fisher LSD) ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc., USA).

IV.4.4. Producción de fumonisinas

Para determinar la capacidad de producir fumonisinas se siguió la metodología propuesta por Frisvad y col. (2007b). Se inocularon todas las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* (Identificadas como *A. niger/A. welwitschiae*), en tres puntos equidistantes entre el borde y el centro de una placa de Petri conteniendo el medio CY20S y se incubó durante 7 días en la oscuridad a 25° C.

Se tomaron cinco tacos de agar (6 mm de diámetro) del centro de la colonia hacia el borde de la placa. Los cinco tacos de agar se colocaron en un frasco de vidrio de 1,5 ml a los cuales se le adicionaron 750 μ l de una mezcla metanol: agua (75:25, v/v), luego se sometieron a ultrasonido durante 50 min. Los extractos se filtraron utilizando un filtro 0,45 μ m y se llevó a sequedad con N₂ gaseoso. Luego se resuspendió en 100 μ l de acetonitrilo: agua (1:1, v/v). Una alícuota (50 μ l) de esta solución se derivatizó con 200 μ l de una solución de o-ftaldialdehído (OPA). El análisis se llevó a cabo mediante un sistema de detección con fluorescencia por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) Hewlett Packard Serie 1100. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ l de tamaño de partícula; Phenomenex, Luna), conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20 x 4,6 mm, 5 μ l de tamaño de partícula, Supelco).

La fase móvil empleada fue una mezcla de metanol: 0,1M de fosfato monosódico (75:25, v/v) a un flujo de 1,5 ml/min. La fluorescencia de FB₂ fue registrada a una

longitud de onda de 335 nm de excitación y 440 nm de emisión. El tiempo de retención de dicha micotoxina fue de aproximadamente de 16 minutos.

Las soluciones testigos fueron preparadas disolviendo FB₂ pura (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.) en acetonitrilo: agua (1:1, v/v) grado HPLC. La cuantificación de FB₂ se realizó por medición de la altura de los picos y su extrapolación a una curva de calibración realizada con distintas concentraciones de las soluciones testigos de FB₂ (1,5 µg/ml, 3 µg/ml y 6 µg/ml). El límite de detección de FB₂ fue 0,3 µg/g.

IV.4.4.1. Confirmación de FB₂ por HPLC-MS/MS

A fin de confirmar la producción de FB₂ de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, se procedió a la determinación por HPLC-MS/MS.

Los análisis fueron realizados en HPLC-MS/MS Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Alliance 2685, un autoinyector Waters Alliance 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tandem (Quattro Ultima Platinum) con fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una XBridge C18 3,5 µm (2,1 x 150 mm) con precolumna.

La interfase se trabajó en modo de ionización electrospray positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150° C y 200° C, respectivamente. El voltaje del capilar fue de 3,00 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 104 L/h y 678 L/h para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. Para la determinación de FB₂ se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de FB [M+H]⁺ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante un software Mass Lynx V.4.1 Copyright 2005, Waters INC.

La fase móvil a utilizar consistió en un gradiente de ácido acético al 1% en agua y acetato de amonio 5mM (solvente A) y metanol al 0.1 %-ácido acético al 1%- acetato de amonio 5 mM (solvente B). La temperatura de la columna fue mantenida a 22° C. Alícuotas de 30 µl de extractos fueron inyectados en la unidad HPLC. Cuatro puntos de identificación fueron usados para identificar FB₂, tiempo de retención 16,62 min, el precursor [M + H]⁺ de 706 amu y ambos productos iónicos (336 y 318 amu).

IV.5. Evaluación de la diversidad genética de *Aspergillus* sección *Nigri* a través del uso de marcadores neutros, Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs).

IV.5.1. Optimización de un protocolo para estudiar la diversidad de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizando el perfil ISSR

IV.5.1.1. Cepas

Para la optimización de un protocolo para evaluar el marcador molecular ISSR se estudiaron cepas anteriormente identificadas por análisis preliminares de máxima parsimonia utilizando el gen parcial calmodulina: *A. welwitschiae* ANRC 524; *A. ibericus* ANRC 500, *A. luchuensis* ANRC 703 y las cepas de referencia (*A. japonicus* ITEM 7034; *A. aculeatus* ITEM 7046; *A. uvarum* ITEM 4834; *A. niger* FRR 5695; *A. tubingensis* ITEM 4845; *A. carbonarius* A2034).

IV.5.1.2. Reacciones de PCR

IV.5.1.2.1. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Invitrogen), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen), 2,5 mM MgCl₂, 0,7 µM de cada cebador (ISSR 2; ISSR 3; ISSR4; ISSR 5; ISSR 6; ISSR 7; ISSR 8; ISSR 10; ISSR 11; ISSR 12; ISSR 13; ISSR 14; ISSR 15) (Tabla IV.2), y 2,5 µl de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 25 µl.

Mezcla de reacción de PCR optimizadas (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Invitrogen), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,5 U *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 0,9 µM de cada cebador (ISSR1; ISSR9), y 2,5 µl de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 25 µl.

Programa de PCR (ISSR): 1 ciclo a 94° C por 7 min, seguido por 33 ciclos a 94° C por 60 s, 53° C por 75 s (dependiendo del cebador utilizado Tabla IV.2), 72° C por 4 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

IV.5.1.2.2. Metodología

Se evaluaron un total de 15 cebadores seleccionados al azar (Tabla IV.2) y se variaron las concentraciones de los mismos (0,2 – 0,8 μM) así como, la concentración de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). La concentración de ADN templado fue de aproximadamente 20 ng en un volumen final de 25 μl . Por otro lado, se optimizó el programa de PCR (temperaturas y tiempos) variando principalmente la temperatura de apareamiento teniendo en cuenta la *T_m* de los cebadores (Tabla IV.2). Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó en cada experimento y cada reacción se realizó al menos dos veces. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$), y fueron fotografiados usando un digitalizador de imágenes (MiniBIS Pro, DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100–2072 pb.

Tabla IV.2. Secuencias y temperaturas de apareamiento de los cebadores ISSR usados como técnica *fingerprint* en *Aspergillus* sección *Nigri*.

Primer ISSR	Secuencia 5' – 3'	Temperatura de apareamiento
1	(GAG) ₅ CAG	53 °C
2	GTC(GAC) ₅	55 °C
3	(AG) ₈	48 °C
4	(AG) ₈ G	47 °C
5	GAT(AGG) ₈	53 °C
6	CTC(GT) ₈	53 °C
7	AG(CTC) ₅	51 °C
8	CT(GA) ₈	53 °C
9	(GA) ₈ T	45 °C
10	(GA) ₈ C	47 °C
11	GAC(CGCA) ₄	61 °C
12	(GTG) ₅	45 °C
13	(GACA) ₄	43 °C
14	(GCC) ₅	66 °C
15	(CAC) ₅	53 °C

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos cebadores que permitieron una buena discriminación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, principalmente en base al número e intensidad de bandas obtenidas y a su habilidad de amplificar consistentemente los mismos fragmentos dado el mismo aislado.

IV.5.1.3. Análisis de los datos

Para analizar los perfiles de ISSR, se determinó la presencia o ausencia de las bandas en cada una de las cepas evaluadas. Las bandas del mismo tamaño molecular en las diferentes cepas se consideraron que representan 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 carácter con dos posibles estados, presencia (1) y ausencia (0), y se construyó una matriz binaria para cada cebador. Para estimar la distancia genética entre los individuos, se calculó el coeficiente de similitud usando la fórmula $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, donde N_x y N_y representan el número de fragmentos amplificados en las cepas x y y , respectivamente, y N_{xy} representa el número de fragmentos compartidos por ambas cepas (Nei & Li 1979). La distancia genética se derivó del coeficiente de similitud como $D = 1 - S$. Los dendogramas resultantes fueron realizados utilizando el algoritmo UPGMA (unweightedpair-group método de medias aritméticas) en el programa NTSYSpc 2.01 (NumericalTaxonomySystem) (Rohlf 1990). El coeficiente de correlación cofenético (CCC) fue elegido para indicar el nivel de distorsión entre la matriz de similitud y el análisis de cluster. Los valores de *bootstraps* se determinaron usando el programa PAUP versión 4.0 (Swofford 2000). Un análisis de componentes principales basados en las matrices de similitudes genéticas fue llevado a cabo con las opciones DCENTER y EIGEN en NTSYS para identificar el número de grupos basados en vectores eigen. El resultado del análisis de componentes principales fue graficado utilizando el módulo Mod3D.

IV.5.2. Análisis de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* a través de ISSR

Una vez optimizada la reacción en cuanto a la repetitividad y reproducibilidad, se analizaron las demás cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de los diferentes sustratos de interés. Se seleccionaron los cebadores ISSR 1, ISSR 2, ISSR 5, ISSR 6, ISSR 7, ISSR 9 e ISSR 11 (Tabla IV.2) los cuales permitieron una buena

discriminación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, principalmente en base al número e intensidad de bandas obtenidas y a su habilidad de amplificar consistentemente los mismos fragmentos dado el mismo aislado.

IV.5.2.1. Cepas

Se seleccionaron al azar 23 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* previamente identificadas por metodología molecular como *A. niger/A. welwitchiae* (9), *A. tubingensis* (5), *A. luchuensis* (1), *A. neoniger* (1), *A. carbonarius* (5) y *A. japonicus/A. aculeatus* (2) provenientes de diferentes sustratos y regiones geográficas (Tabla IV.3) y se incluyeron además las cepas utilizadas en la optimización del marcador ISSR (punto IV.5.1.1.).

Tabla IV.3. Cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* seleccionadas al azar, provenientes de diferentes sustratos y diferentes regiones geográficas evaluadas a través del marcador ISSR.

Especie	Cepa	Origen	Región geográfica
<i>A. luchuensis</i>	ANRC 700	Café	Sur de Córdoba
<i>A. niger/A. welwitchiae</i>	ANRC 701	Café	Sur de Córdoba
<i>A. neoniger</i>	ANRC 702	Café	Sur de Córdoba
<i>A. niger</i>	ANRC 704	Café	Sur de Córdoba
<i>A. niger/A. welwitchiae</i>	ANRC 401	Desechos de Maní	Sur de Córdoba
<i>A. tubingensis</i>	ANRC 402	Desechos de Maní	Sur de Córdoba
<i>A. niger/A. welwitchiae</i>	ANRC 403	Maní	Sur de Córdoba
<i>A. niger/A. welwitchiae</i>	ANRC 407	Maní	Acequias (Córdoba.)
<i>A. japonicus/A. aculeatus</i>	ANRC 406	Maní	Acequias (Córdoba.)
<i>A. carbonarius</i>	ANRC 502	Pasas de uvas	San Juan
<i>A. carbonarius</i>	ANRC 514	Pasas de uvas	San Juan
<i>A. tubingensis</i>	ANRC 518	Pasas de uvas	San Juan
<i>A. tubingensis</i>	ANRC 527	Pasas de uvas	San Juan
<i>A. japonicus/A. aculeatus</i>	ANRC 529	Pasas de uvas	San Juan
<i>A. japonicus/A. aculeatus</i>	ANRC 530	Pasas de uvas	San Juan
<i>A. carbonarius</i>	ANRC 601	Suelo	Chilecito (La Rioja)
<i>A. awamori</i>	ANRC 603	Suelo	Serrano (Córdoba.)
<i>A. niger/A. welwitchiae</i>	ANRC 300	Uvas	Mendoza
<i>A. tubingensis</i>	ANRC 301	Uvas	Mendoza
<i>A. carbonarius</i>	ANRC 202	Residuo de cervecería	Villa Gral. Belgrano
<i>A. carbonarius</i>	ANRC 204	Residuo de cervecería	Villa Gral. Belgrano
<i>A. niger/A. welwitchiae</i>	ANRC 104	Soja	Acopio Sur de Córdoba
<i>A. tubingensis</i>	ANRC 123	Soja	Acopio Sur de Córdoba

Posteriormente se procedió a analizar a cada grupo de cepas teniendo en cuenta su origen de aislamiento (maní, soja y pasas de uvas), utilizando tres de los siete cebadores seleccionados (ISSR 6, ISSR 7 e ISSR 11) (Tabla IV.2).

IV.6. Análisis de secuencias del gen calmodulina

IV.6.1. Cepas

Se seleccionaron 111 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en base a la diversidad encontrada por morfología clásica, cebadores específicos e ISSRs: 98 pertenecientes al agregado *A. niger*, 7 cepas de *Aspergillus* Uniseriadas, 6 cepas pertenecientes a la Serie Carbonaria. Además se recopilaron secuencias del gen calmodulina (Tabla IV.4) de las diferentes especies de *Aspergillus* sección *Nigri* disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

IV.6.2. Reacciones de PCR

IV.6.2.1. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR optimizadas (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3; 1,5 mM MgCl₂), 1,5 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,3 μM de cada cebador (CL1/CL2A), y 5 μl de ADN templado (aproximadamente 20 ng); en un volumen final de 50 μl.

Programa de PCR (cebador CL1/CL2A): 1 ciclo a 94° C por 5 min, seguido por 34 ciclos a 94° C por 50 s, 58° C por 50 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

IV.6.2.2. Metodología

Las secuencias de la región del gen de la calmodulina fueron amplificadas por PCR (O'Donnell y col., 2000). Un control negativo que no contenía ADN templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos. Las amplificaciones se realizaron en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las condiciones descritas en el **punto**

IV.6.1.1. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% tiñendo con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, Inc., 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 – 2072 pb. Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambas cadenas de ADN se secuenciaron con cada par de cebadores utilizados usando un secuenciador Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GeneBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología con otras especies. Las secuencias de ambas cadenas de ADN de los productos de PCR se alinearon usando el programa MAFFT versión 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) (Kato & Standley, 2013).

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el método de máxima parsimonia usando el programa TNT 1.1 (*Tree analysis using New Technology*) (Goloboff y col., 2008). La búsqueda heurística consistió en la creación de árboles de Wagner con 100 secuencias de adicción al azar de los taxos o RAS (*Random Addition Sequences*), con combinación de permutación de ramas tipo TBR (*Tree Bisection Reconnection*), guardando 10 árboles por réplica y una ronda final de TBR sobre los árboles parsimoniosos encontrados en las réplicas. El soporte de los nodos presentes en los árboles parsimoniosos se calculó utilizando Bootstrap con 1000 réplicas. Los índices de consistencia (grado de homoplasia) y retención (grado de sinapomorfía aparente) se calcularon para todos los árboles parsimoniosos a través del scrip del software TNT, STATS.RUN (Goloboff y col., 2008). Finalmente se realizó el consenso estricto para resumir la información no contradictoria de los grupos monofiléticos presentes. *A. flavus* CBS 100927 se utilizó como grupo externo.

Tabla IV.4. Secuencias y cepas usadas en el análisis de parsimonia.

Cepa	Especies	Nº Acceso GenBank Calmodulina	Fuente de aislamiento	Región Geográfica
CBS 115574	<i>A. costaricaensis</i>	FN594545	Suelo	Costa Rica
KACC 45132	<i>A. piperis</i>	JX500075.1	Desconocido	Este Asiático
KACC 45133	<i>A. piperis</i>	JX500076.1	Desconocido	Este Asiático
CBS 113365	<i>A. vadensis</i>	EU163269	Desconocido	Desconocido
CBS 115656	<i>A. neoniger</i>	FJ491700	Agua de Mangle	Venezuela
ITEM 7040	<i>A. tubingensis</i>	AJ964876	Desconocido	Francia
IMI 381727	<i>A. brasiliensis</i>	AM295175	Suelo	Brasil
CBS 122712	<i>A. eucalypticola</i>	EU482433	<i>Eucalyptus leaves</i>	Australia
CBS 564.65	<i>A. luchuensis</i>	FN594547	Desconocido	Japón
NRRL 341	<i>A. foetidus</i>	EF661155	Desconocido	Japón
CBS 12128	<i>A. foetidus</i>	FJ491694	Awamori-Koji	Japón
CBS 101883	<i>A. lacticoffeatus</i>	EU163270	Granos de Café	Indonesia
ITEM 4501	<i>A. niger</i>	AJ964872	Desconocido	Estados Unidos
ITEM 4509	<i>A. welwitschiae</i>	AJ964874	Uvas	Italia
ITEM 4503	<i>A. carbonarius</i>	AJ964873	Uvas	Italia
CBS 115572	<i>A. sclerotioniger</i>	EU163271	Granos de Café	India
ITEM 4776	<i>A. ibericus</i>	AJ971805	Uvas	Portugal
CBS 121057	<i>A. sclerotii carbonarius</i>	EU159235	Granos de <i>Robusta coffee</i>	Tailandia
ITEM 4505	<i>A. ellipticus</i>	AM117809	Suelo	Costa Rica
ITEM 7045	<i>A. heteromorphus</i>	AM421461	Contaminación de cultivo	Brasil
ITEM 7034	<i>A. japonicus</i>	AJ964875	Desconocido	Desconocido

Tabla IV.4. Continuación.

CBS 12327	<i>A. violaceofuscus</i>	FJ491698	Suelo	Puerto Rico
CBS 114.80	<i>A. indologeus</i>	AM419750	Suelo	India
ITEM 4834	<i>A. uvarum</i>	AM745755	Uvas	Italia, Apulia
CBS 121060	<i>A. aculeatinus</i>	EU159241	Granos de Arabica coffee	Tailandia
CBS 31389	<i>A. fijensis</i>	FJ491695	Suelo	Fiji
ITEM 7046	<i>A. aculeatus</i>	AJ964877	Suelo Tropical	Desconocido
ITEM 7556	<i>A. homomorphus</i>	AM887865	Suelo	Israel
CBS 127449	<i>A. saccharolyticus</i>	HM853554	Madera tratada	Dinamarca
CBS 100927	<i>A. flavus</i>	EF202063	Celofán	Isla de Pacifico Sur
ITEM 14821	<i>A. trinidadensis</i>	HE984434.1	Muestra ambiental	Trinidad y Tobago
ITEM 14783 ^T	<i>A. floridensis</i>	HE984429.1	Muestra ambiental	Estados Unidos, Florida

IV.7. Diseño de cebadores específicos de especie

IV.7.1. Reacciones de PCR

IV.7.1.1. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción de reamplificación): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,3 μ M cebador (ISSR (Tabla IV.3)), 1,5 mM de Cl_2Mg y 5 μ l de ADN templado; en un volumen final de 50 μ l.

Programa de PCR (cebadores ISSR, reamplificación): 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 33 ciclos a 94° C por 1min, 58° C por 50 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción, directo de colonia): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,5 μ M cebador M13F y M13R, 1,5 mM de Cl_2Mg y 5 μ l de ADN templado; en un volumen final de 50 μ l.

Programa de PCR (M13F/M13R): 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 30 ciclos a 94° C por 18 s, 55° C por 18 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

IV.7.2. Metodología

Los fragmentos considerados específicos de especies se escindieron del gel de agarosa y posteriormente se disolvieron en agua bidestilada estéril (proporción: 10 mg de gel: 10 μ l de agua) a 45° C en baño térmico por 10 min. Luego se re-amplificaron utilizando el cebador ISSR correspondiente con las condiciones descritas en el punto IV.7.1.

Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio a fin de verificar la amplificación de un único producto y estimar su tamaño. Dicho producto se purificó utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante y posteriormente dichos fragmentos fueron clonados con las condiciones descritas en el punto IV.7.3, para su posterior secuenciación.

IV.7.3. Clonado de los fragmentos específicos

IV.7.3.1. Materiales

- Medio LB (Luria-Bertani): Tripteína Bacteriológica 10,0 g; Extracto de levadura 5,0 g; NaCl 5,0 g; H₂O deionizada hasta completar 1.000 ml.
- IPTG solución stock 0,1M: 1,2 g de IPTG en volumen final de 50 ml de agua destilada, esterilizado por filtración y almacenado a 4°C.
- X-Gal 2ml: 100 mg 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactosidasa disuelto en 2 ml de N, N' dimetil formamida. Almacenado a -20°C cubierto con papel aluminio.
- Medio SOC: Tripteína Bacteriológica 10,0 g; Extracto de levadura 0,5 g; 1 ml de NaCl 1 M; 0,25 ml de KCl 1 M; 1 ml de Mg⁺⁺ 2M y 1 ml Glucosa 2 M (esterilizado por filtración).
- Mg⁺⁺ 2M: 20,33 g de MgCl₂ 6 H₂O; 24,65 g de MgSO₄ 7 H₂O en volumen final de 100 ml de agua destilada. Esterilizado por filtración.
- Células competentes: JM109 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK⁻, mK⁺), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacIqZΔM15*]). Promega.
- Medio LB suplementado con ampicilina: 15 g de agar a un litro de medio de LB. Esterilizado en autoclave. Aproximadamente a los 50°C se colocó ampicilina a volumen final de 100 µg/ml.
- Medio LB con Ampicilina/IPTG/X-Gal: Diseminación con espátula de drigalsky de 100 µl de IPTG 100 mM y 2 µl de X-Gal 50 mg/ml a las placas de Medio LB suplementado con ampicilina. Secado en estufa a 37°C durante 30 min.

IV.7.3.2. Ligación

Mezcla de reacción ligación (para una reacción): 1X Buffer de ligación rápida T4 DNA Ligasa; 1µl de pGEM-T (50ng); * µl del producto de PCR (15ng); 1µl de T4 DNA Ligasa (3 Weiss units/µl); en un volumen final de 10 µl (agua libre de nucleasas). Dichas reacciones se incubaron durante la noche a 4 ° C.

* Radio Molar de producto de PCR: vector (3:1)

IV.7.3.3. Transformación bacteriana

A las células competentes (JM109, Promega) 50 μ l, se agregó 2 μ l de la mezcla resultante de la ligación. Se incubaron durante 30 min en hielo y luego se realizó un choque térmico a 42° C durante 45-50 segundos. Inmediatamente se colocaron los tubos en hielo. Posteriormente se adicionó 950 μ l de medio SOC y se incubó a 37° C durante 1,5 h. Luego de esta incubación se sembraron 100 μ l en una placa con medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml), y se incubaron a 37° C por un día. Para facilitar la coloración de las colonias para su selección se incubaron a 4° C (Sambrook y col., 1989).

IV.7.4. PCR directo de colonia

Luego del periodo de incubación, se seleccionaron colonias blancas de cada fragmento de interés ligado. Dichas colonias fueron repicadas en LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas a 37° C por un día. A partir de las mismas se realizó una disolución en agua libre de nucleasas, posteriormente se incubaron por 10 min a 100° C. Luego se utilizaron éstas últimas como molde (para confirmar la presencia del inserto de interés) para realizar una PCR con las condiciones descritas en el punto IV.7.1, de cada colonia seleccionada y repicada de cada clon.

IV.7.5. Reacción de clivaje

Mezcla de reacción de clivaje (para una reacción): 1X Buffer H; 5 μ l de plásmido (500-1000 ng); 0,2 μ l de BSA (0,1 μ g/ μ L); 0,1 μ l de *EcoRI* (1 U; stock 12 U); en un volumen final de 20 μ L (agua libre de nucleasas). Dichas reacciones se incubaron a 37° C por 2 hs.

IV.7.5.1. Metodología

Las reacciones de clivaje se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se visualizaron con un digitalizador MiniBis Pro (DNR), a fin de verificar la liberación de los fragmentos clonados. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, Inc., 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 – 2072 pb.

IV.7.6. Análisis de secuencias de los fragmentos específicos

Los datos de la secuencia de la banda obtenida se alinearon con el programa BioEdit versión 4.7.8n y se compararon con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information). A partir de dicha secuencia, se diseñaron cebadores específicos con el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm>) y se sintetizaron (Invitrogen).

Para todos los cebadores diseñados se optimizaron las condiciones de amplificación, utilizando diferentes condiciones de PCR a fin de lograr buena intensidad de amplificación y especificidad, variando la concentración de Mg (1.5, 1.75, 2.0, 2.25 y 2.5 mM), la concentración de los cebadores (0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 μ M) y las temperaturas de apareamiento (50 a 60° C). La concentración de ADN templado en cada reacción fue de ~ 10 ng y la de cada dNTPs de 0.2 mM. En todas las reacciones se utilizó un control negativo y el control positivo correspondiente. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimaron por comparación con ADN testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 – 2072 pb.

La sensibilidad de las reacciones de PCR fue evaluada usando diferentes concentraciones de ADN de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 100 fg, 10 fg y 1 fg por microlitro en una mezcla de reacción de PCR de 20 μ l. Una vez obtenidas las condiciones de PCR óptimas se evaluó la especificidad de los cebadores diseñados usando ADN puro de diferentes cepas fúngicas.

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,2 μ M de cebador Fibe1 y Fibe2, 1,5 mM de $MgCl_2$ y 2,5 μ l de ADN templado; en un volumen final de 20 μ l.

Programa de PCR (Fibe): 1 ciclo a 94° C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94° C por 1min, 57° C por 30 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

IV.8. Múltiple PCR utilizando los cebadores CARBO1/2 y Fibe/Ribe

IV.8.1. Reacciones de PCR

IV.8.1.1. Materiales y condiciones de reacción

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,2 µM de cebador Fibe1 y Fibe2, 0,5 µM de cebador CARBO1 y CARBO 2; 1,5 mM de MgCl₂ y 2,5 µl de ADN templado; en un volumen final de 20 µl.

Programa de PCR (Múltiple PCR Fibe/CARBO): 1 ciclo a 94° C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94° C por 1min, 57° C por 30 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

IV.8.2. Metodología

Se utilizaron las condiciones de amplificación descritas en el **punto IV.8.1.1** para la identificación conjunta de *A. carbonarius* y *A. ibericus*. Un control negativo que no contenía el ADN templado se incluyó al experimento. También se incluyeron controles positivos: *A. carbonarius* A2034 y *A. ibericus* ITEM 4776.

La amplificación se realizó en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las condiciones descritas en el **punto IV.8.1.1**. Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se visualizaron con un digitalizador MiniBis Pro (DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Promega, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100–1500 pb.

V. Resultado y Discusión

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1. Identificación de las cepas mediante caracteres morfológicos

En el presente estudio se evaluaron 194 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes sustratos, 9 de ellas fueron clasificadas como *Aspergillus* uniseriados, 28 como *A. carbonarius* y 157 como pertenecientes al agregado *A. niger*, siguiendo la clave taxonómica de Klich (2002). Las especies uniseriadas fueron aisladas únicamente de pasas de uvas y maní, y *A. carbonarius* principalmente en pasas de uvas, suelo y residuos de cervecería, mientras que las especies pertenecientes al agregado *A. niger* se aislaron a partir de todos los sustratos analizados (Tabla V.1) (Anexo VIII.1). Por otro lado, se evaluaron las características morfológicas de todas las cepas de referencia descritas en el punto III.1.

Tabla V.1. Número de cepas identificadas como *Aspergillus* sección *Nigri* en los diferentes sustratos.

Fuente	<i>A. carbonarius</i>	agregado <i>A. niger</i>	Uniseriados	Total
Uvas	-	5	-	5
Pasas	23	37	5	65
Café	-	5	-	5
Maní	-	57	4	61
Suelo	2	3	-	5
Soja	-	29	-	29
Residuos de cervecería	3	2	-	5
Almendra	-	13	-	13
Pimienta	-	6	-	6
Total	28	157	9	194

En las figuras V.1, V.2, V.3 y V.4 se muestran las características macromorfológicas de un miembro del agregado *A. niger*, dos cepas Uniseriadas y de una cepa de *A. carbonarius*, respectivamente, en los medios CYA, MEA, CY20S, CZ después de 7 días de incubación a 25° C y en CYA a 37° C.

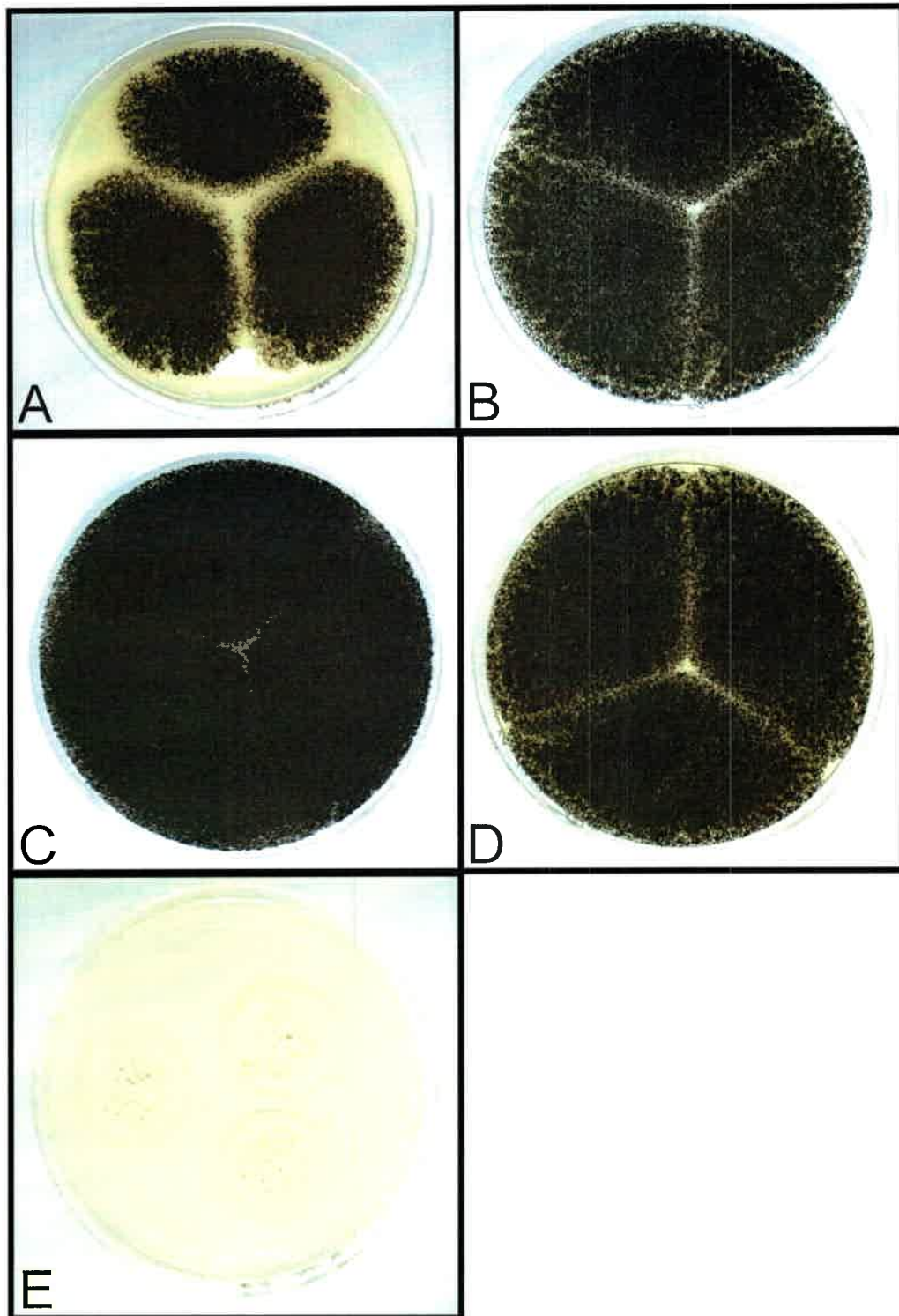


Figura V.1. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* perteneciente al agregado *A. niger* (ANRC 703) en los medios MEA (A), CYA (B), CY20S (C) a 25°C y CYA (D) a 37°C CZ (E) durante 7 días de incubación.

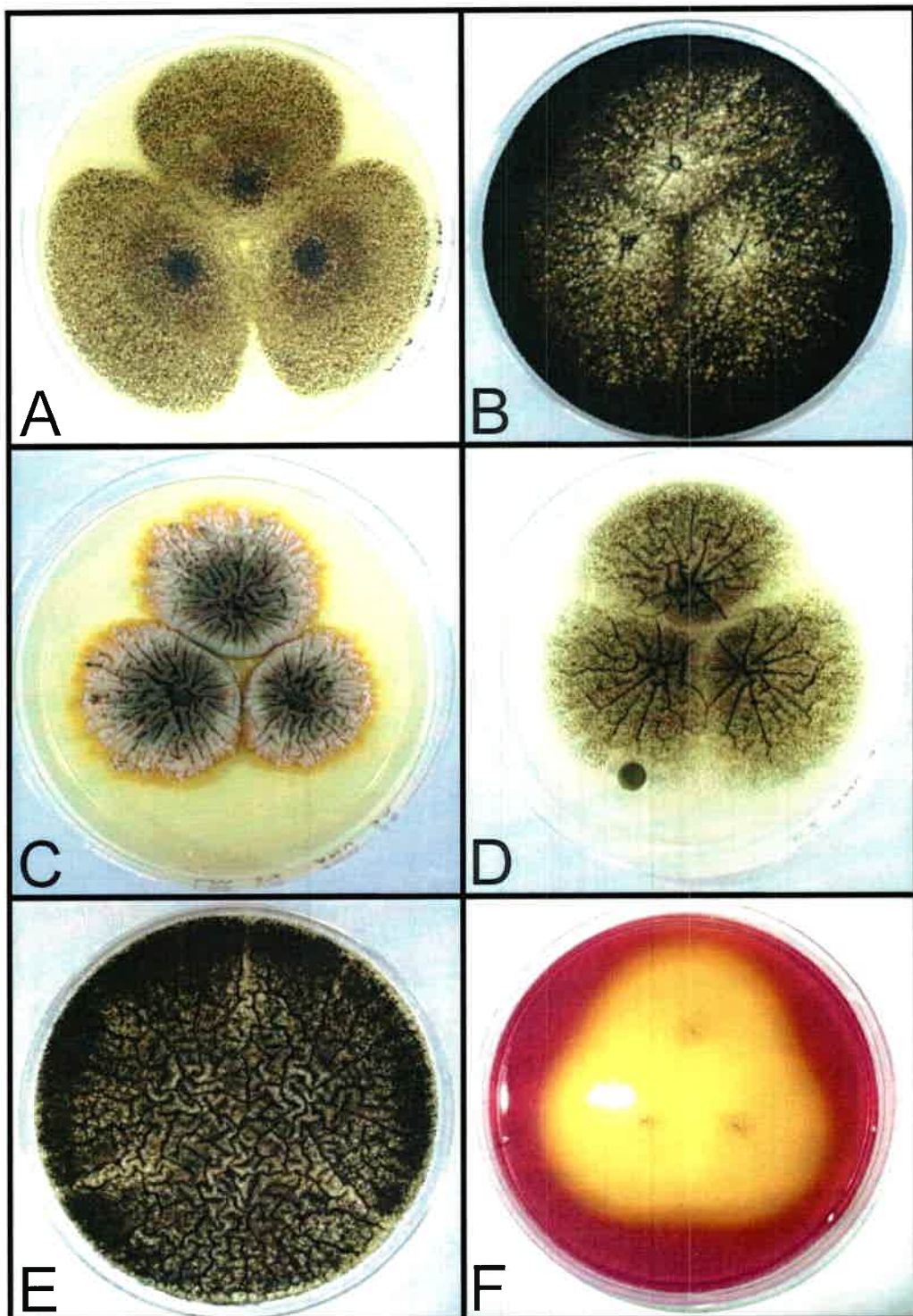


Figura V.2. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* uniseriada (ANRC 530) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (E) y CREA (F) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.

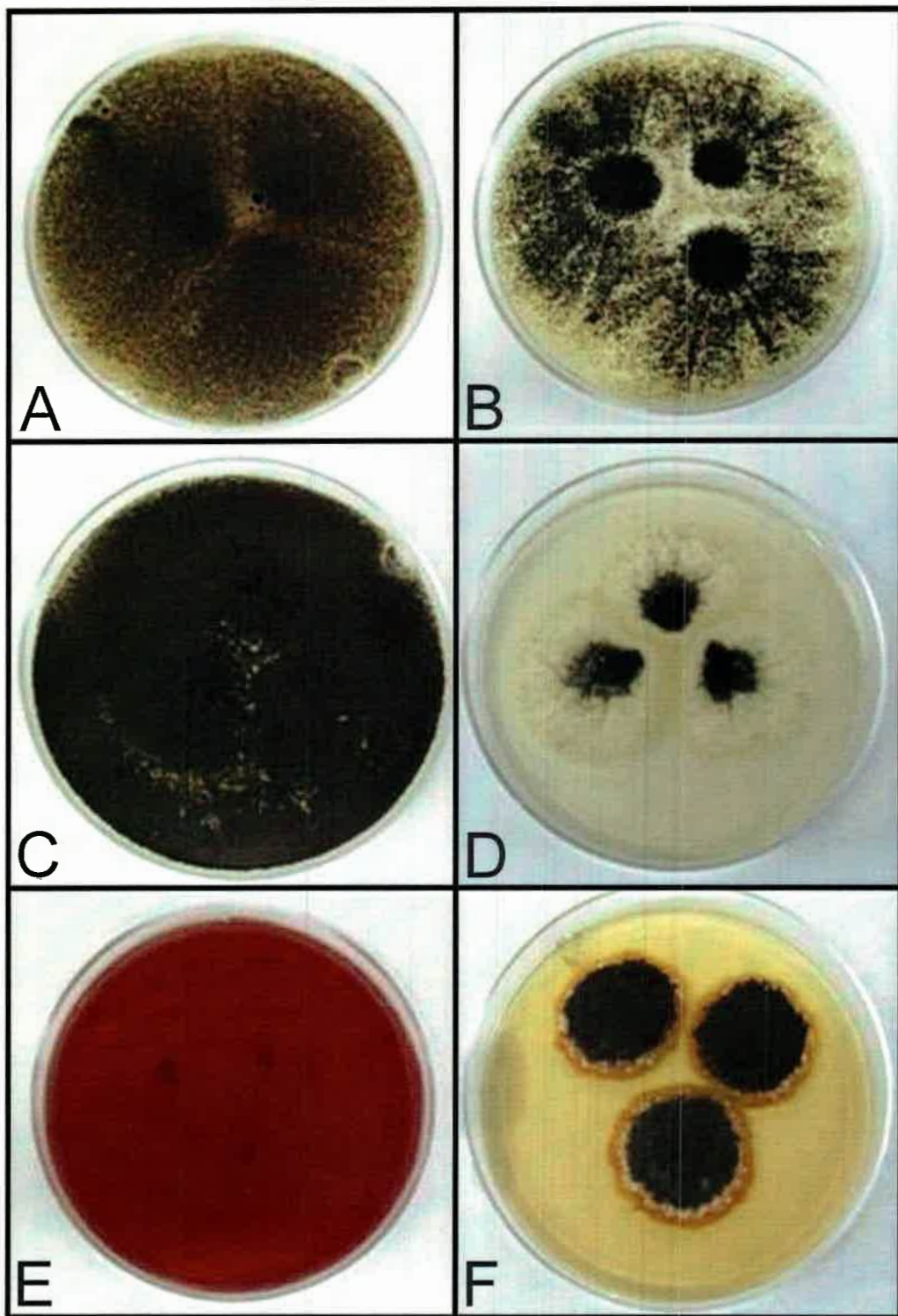


Figura V.3. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* uniseriada (ANRC 426) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (C) y CREA (E) a 25°C y CYA (F) a 37°C durante 7 días de incubación.

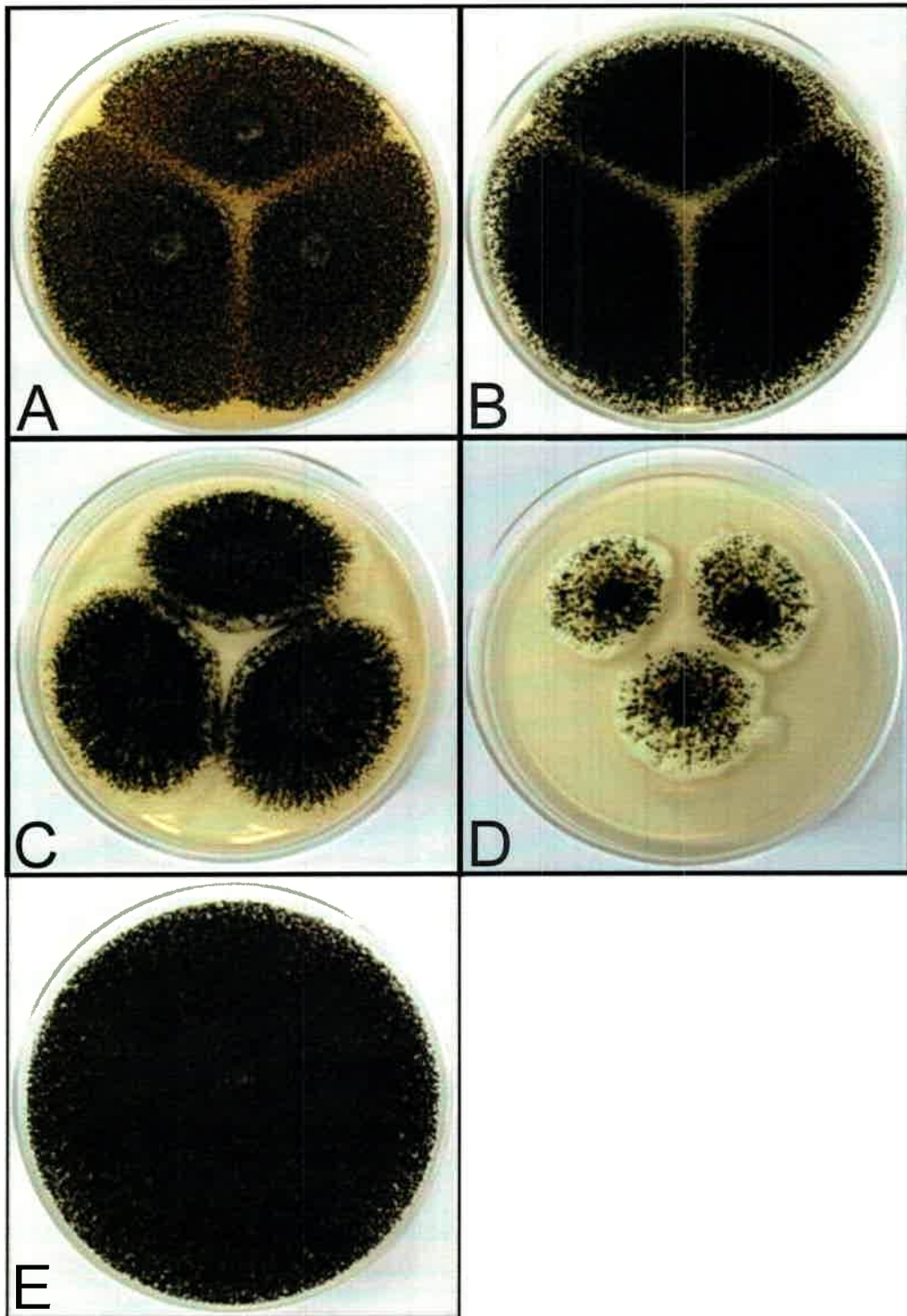


Figura V.4. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *Aspergillus carbonarius* (ANRC 502) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (E) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.

El grupo de especies donde se observaron las mayores variaciones macromorfológicas correspondió al agregado *A. niger*, tanto en las cepas de referencia como en las 157 cepas evaluadas en el presente estudio. En este grupo, las cepas pertenecientes a una misma especie presentaron un patrón de crecimiento variable. Por ejemplo, las 3 cepas de *A. niger* (FRR 5722, FRR 5695 e ITEM 4501) y las 3 cepas de *A. welwitschiae* de referencia evaluadas (FRR 5804, ITEM 4502 e ITEM 4509) exhibieron diferentes patrones de crecimiento en MEA y CYA a 25° C después de los 7 días de desarrollo (Figura V.5).

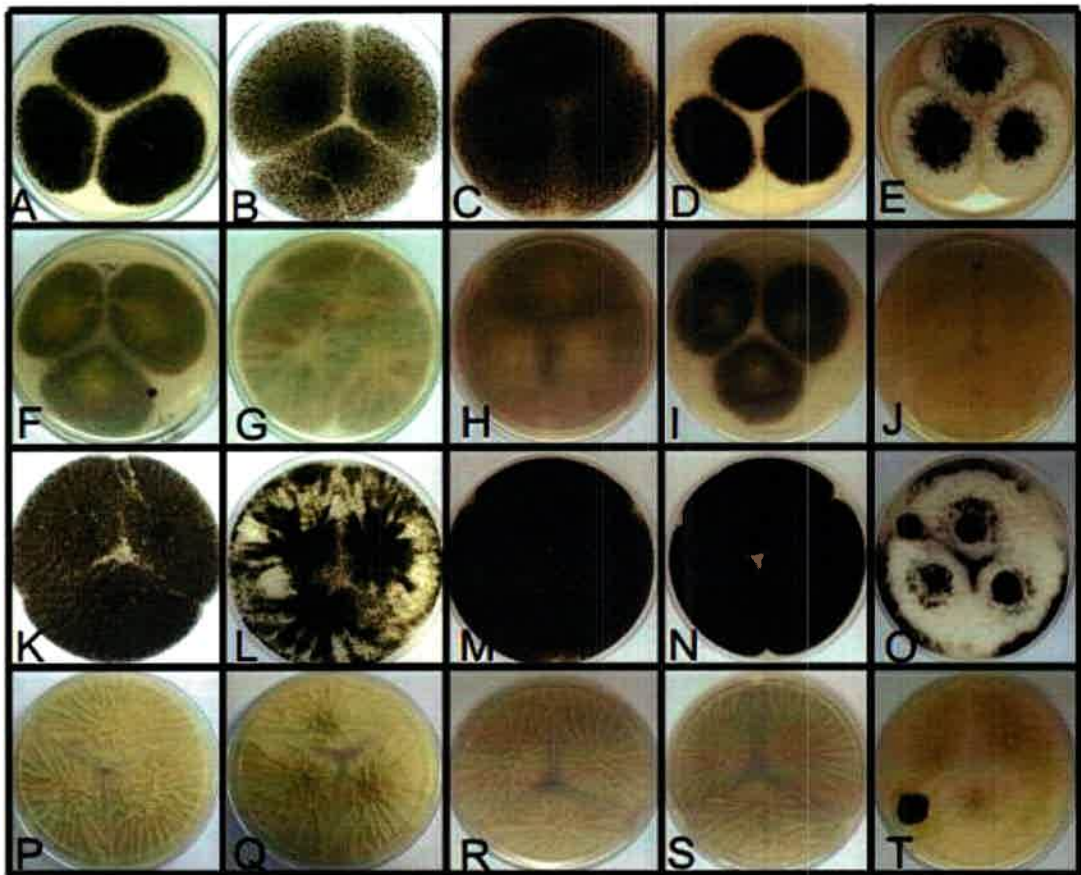


Figura V.5. Morfología de las colonias (anverso y reverso) de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* pertenecientes al agregado *A. niger* en los medios MEA (A-J) y CYA (K-T) a 25°C durante 7 días de incubación. A. *tubingensis* ITEM 4845 (A, E, J, O); *A. niger* FRR 5722 (B, F, K, P); *A. welwitschiae* FRR 5804 (C, G, L, Q); *A. tubingensis* FRR 5720 (D, H, M, R); *A. niger* FRR 5695 (E, I, N, S).

Resultados similares fueron observados entre las 157 cepas pertenecientes al agregado *A. niger* aisladas de los diferentes sustratos. La Figura V.6 muestra las características macromorfológicas de sólo 8 cepas de las 157 analizadas, que fueron identificadas además usando cebadores específicos, de manera de visualizar las variaciones morfológicas encontradas dentro del agregado. Accensi y col. (2001) realizaron un estudio morfológico de 92 aislamientos incluyendo cepas de colección representativas de las diferentes especies del agregado *A. niger*, y determinaron que las medidas registradas de todas las cepas fueron razonablemente coherentes, pero los rangos se superponen, por lo que los caracteres morfológicos evaluados ofrecen poco valor para la diferenciación de especies dentro del agregado *A. niger*. Es por esto que en todas las clasificaciones morfológicas propuestas, la delimitación de algunas especies es problemática debido a que ellas son distinguidas por diferencias relativamente pequeñas.

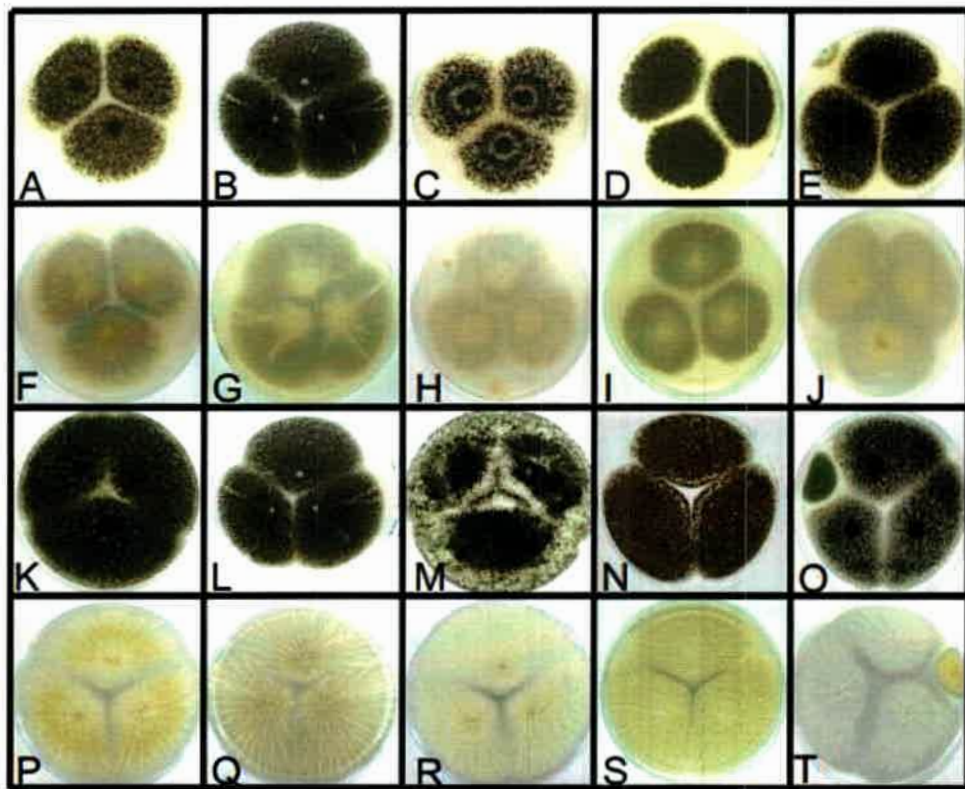


Figura V.6. Morfología de las colonias (anverso y reverso) de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* pertenecientes al agregado *A. niger* en los medios MEA (A-J) y CYA (K-T) a 25°C durante 7 días de incubación. Cepa ANRC 517 (A, E, K, P); cepa ANRC 522 (B, G, L, Q); cepa ANRC 603 (C, H, M, R); cepa ANRC 702 (D, I, N, S); cepa ANRC 602 (E, J, O, T).

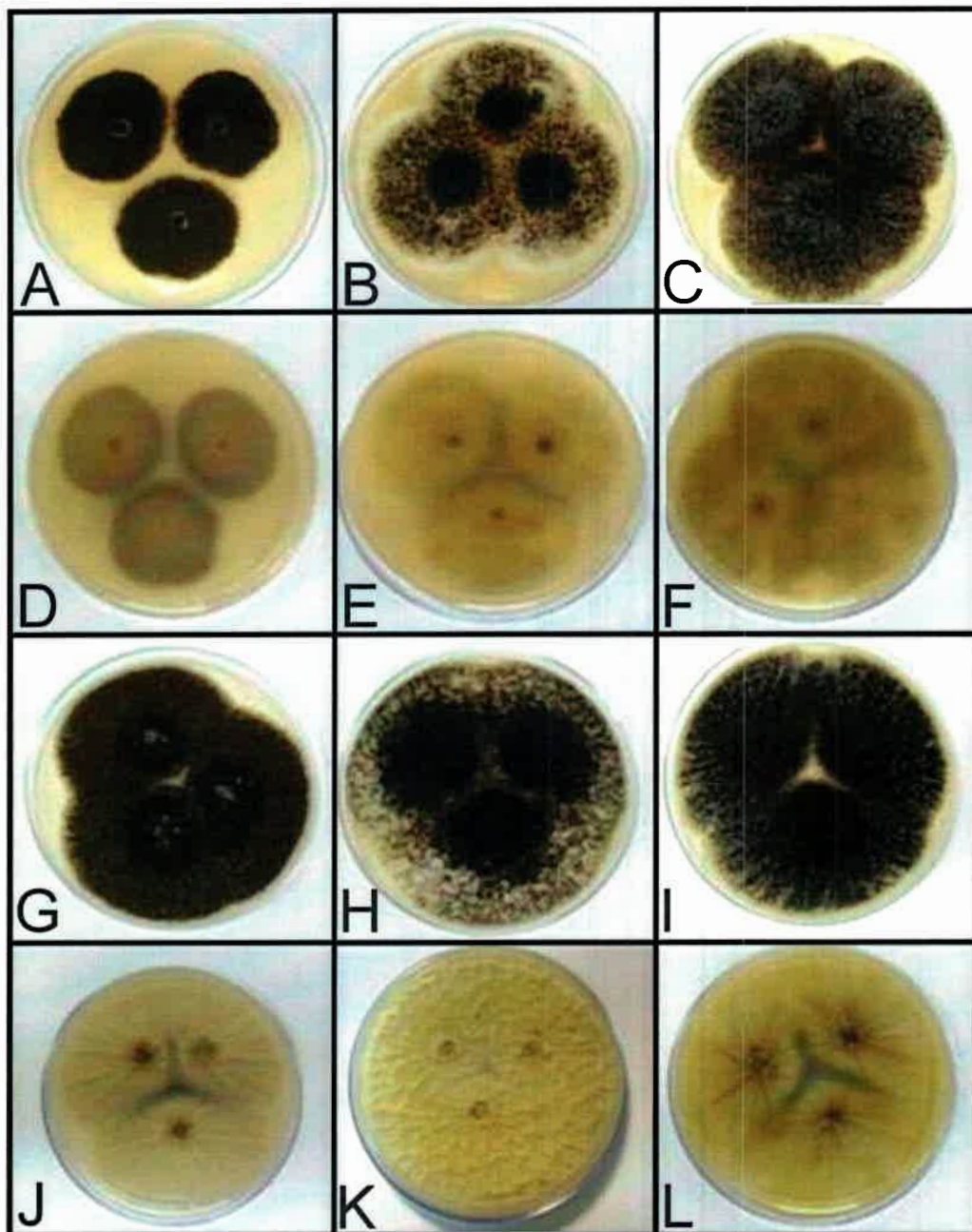


Figura V.6. Continuación. Morfología de las colonias (anverso y reverso) de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* pertenecientes al agregado *A. niger* en los medios MEA (A-F) y CYA (I-P) a 25°C durante 7 días de incubación. Cepa ANRC 415 (A, D, G, J); cepa ANRC 458 (B, E, H, K); cepa ANRC 446 (C, F, I, L).

La cepa ANRC 704 aislada de café, presentó caracteres morfológicos atípicos a dicho agregado. Las colonias en MEA, CYA y CY20S a 25°C después de los 7 días de desarrollo presentaron color blanco amarillento, mientras que en CYA a 37° C la colonia fue de color marrón oscuro a negro, típico de la sección *Nigri* (Figura V.7, Tabla V.2).

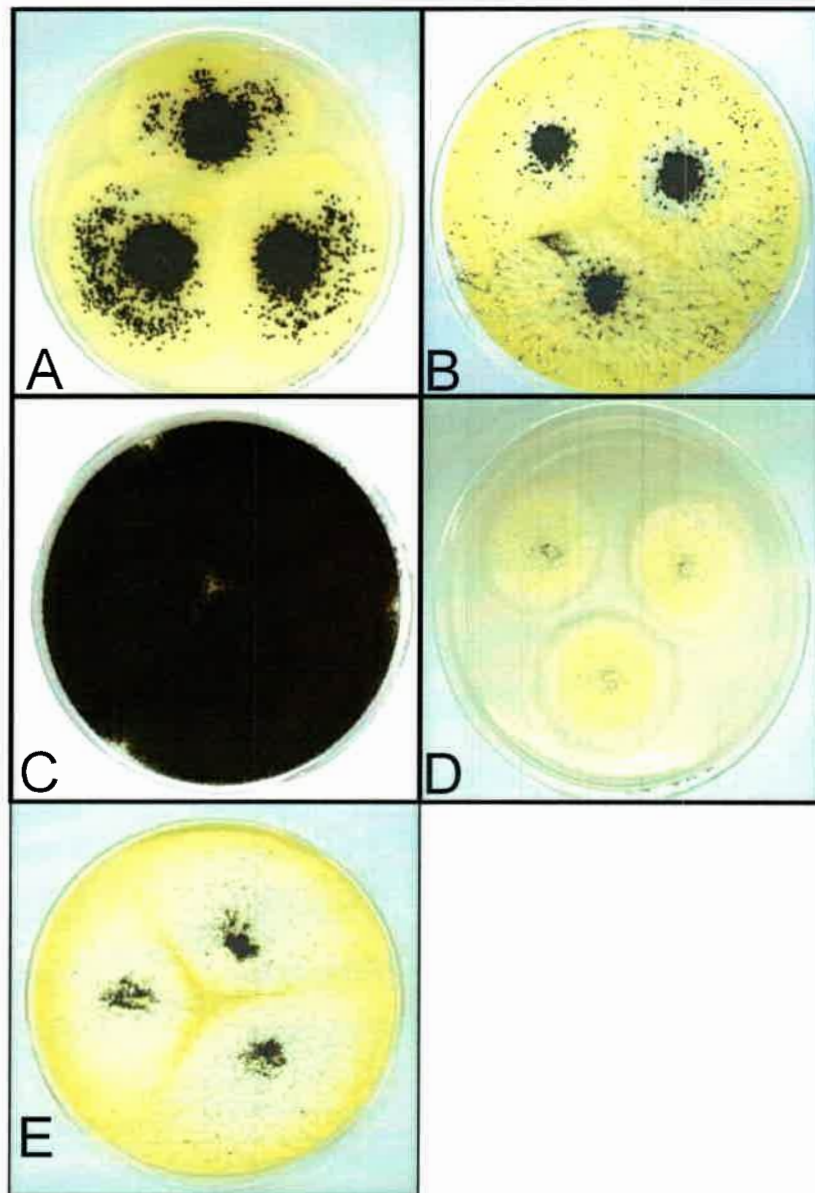


Figura V.7. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *Aspergillus* sección *Nigri* perteneciente al agregado *A. niger* (ANRC 704) en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D) Y CY20S (E) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.

A. lacticoffeatus (ITEM 7559), otra especie perteneciente al agregado *A. niger* presenta diferencias claras en cuanto a la macromorfología; las colonias en MEA, CYA y CY20S a 25°C y CYA a 37°C después de los 7 días de desarrollo fueron de color marrón claro (Figura V.8). A pesar de las características morfológicas distintivas, dicha especie está relacionada filogenéticamente con *A. niger* (Samson y col., 2004). Datos de secuencias indican que *A. lacticoffeatus* es sinónimo de *A. niger*, y además no productor de nafto- γ -pironas. Jørgensen y col. (2011) y Chiang y col. (2010) demostraron una relación entre el pigmento negro y la producción de nafto- γ -pironas a través del gen PksA y denominaron a *A. lacticoffeatus* como una mutante de color de *A. niger*.

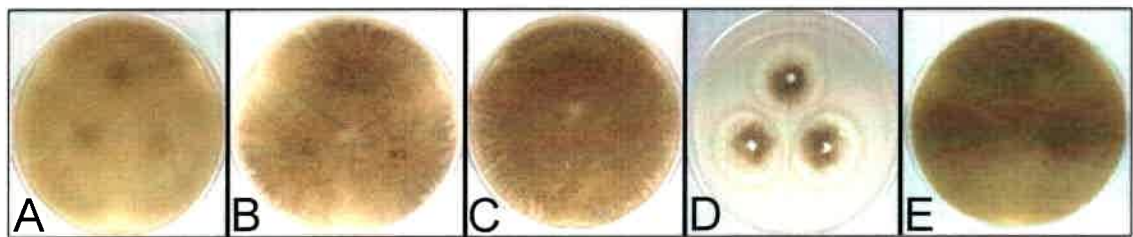


Figura V.8. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *A. lacticoffeatus* ITEM 7559, en los medios MEA (A), CYA (B), CZ (D), CY20S (E) a 25°C y CYA (C) a 37°C durante 7 días de incubación.

De lo anteriormente expuesto, se concluye que el análisis morfológico de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, no resulta adecuado como única herramienta para definir las a nivel de especie. Es bien sabido que las especies del agregado no pueden distinguirse usando solamente este carácter (Samson y col., 2007), por lo que, en el presente estudio se incluyeron dentro del agregado todas aquellas cepas biseriadas cuyos tamaños de conidios fueron menores a 5 μm (Abarca y col., 2004).

Todas las cepas de referencia pertenecientes a la serie Carbonaria evaluadas, *A. carbonarius* FRR 5690, *A. carbonarius* A2034, *A. sclerotioniger* ITEM 7560 y *A. ibericus* ITEM 4776 presentaron características macromorfológicas típicas de cada especie. *Aspergillus sclerotioniger* ITEM 7560 presenta una macromorfología que la distingue de las otras especies de la serie Carbonaria. Dicha especie, no desarrolla en el medio CYA a 37°C, presenta colonias con tonalidades amarillas en MEA, CYA, CY20S y CZ a 25°C después de 7 días de incubación y forma esclerocios amarillo anaranjados en MEA, CYA y CZ a 25°C (Figura V.9).

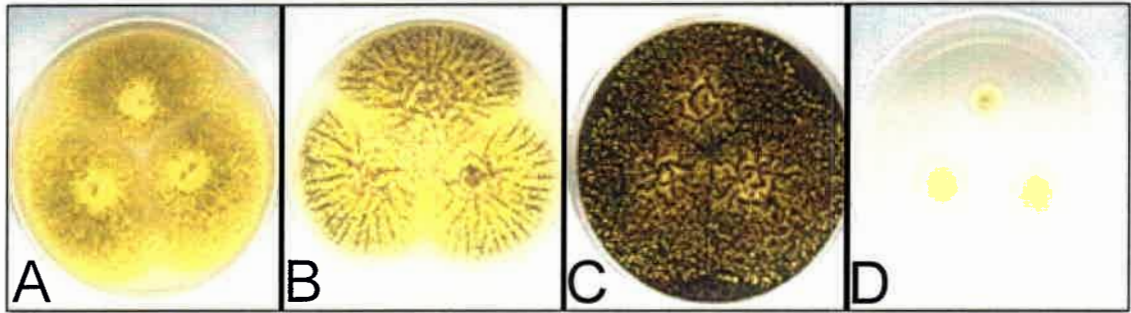


Figura V.9. Morfología de las colonias (anverso) de la cepa de *Aspergillus sclerotioniger* ITEM 7560, en los medios MEA (A), CYA (B), CY20S (C), CZ (D) a 25°C durante 7 días de incubación.

En cambio, *A. ibericus* es fenotípicamente muy similar a *A. carbonarius*, por lo cual no pueden distinguirse morfológicamente. Ambas especies tienen cabezas aspergillares negras, biseriadas con estipes largos y conidos entre 5 y 7 μm . Una característica de ayuda para diferenciar ambas especies es el reverso de la colonia en CZ, en *A. carbonarius* usualmente es oscuro o verde oliva central, mientras que en *A. ibericus* es pálido. Además, en MEA y CZ, *A. ibericus* crece más rápidamente que *A. carbonarius*. Más allá de estas diferencias morfológicas, la principal diferencia radica en el perfil de metabolitos secundarios, no encontrándose cepas de *A. ibericus* capaces de producir OTA mientras que, todas las cepas de *A. carbonarius* son buenas productoras de dicha toxina (Serra y col., 2006).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, 23 cepas aisladas a partir de pasas de uvas, 3 aisladas de residuos de cervecería y 2 aisladas de suelo de viñedos se clasificaron morfológicamente como *A. carbonarius* (Abarca y col., 2004).

Las características macromorfológicas de las cepas de referencia uniseriadas: *A. japonicus* ITEM 7034; *A. aculeatus* ITEM 7046 y *A. uvarum* ITEM 4834 evaluadas se muestran en la Figura V.10.

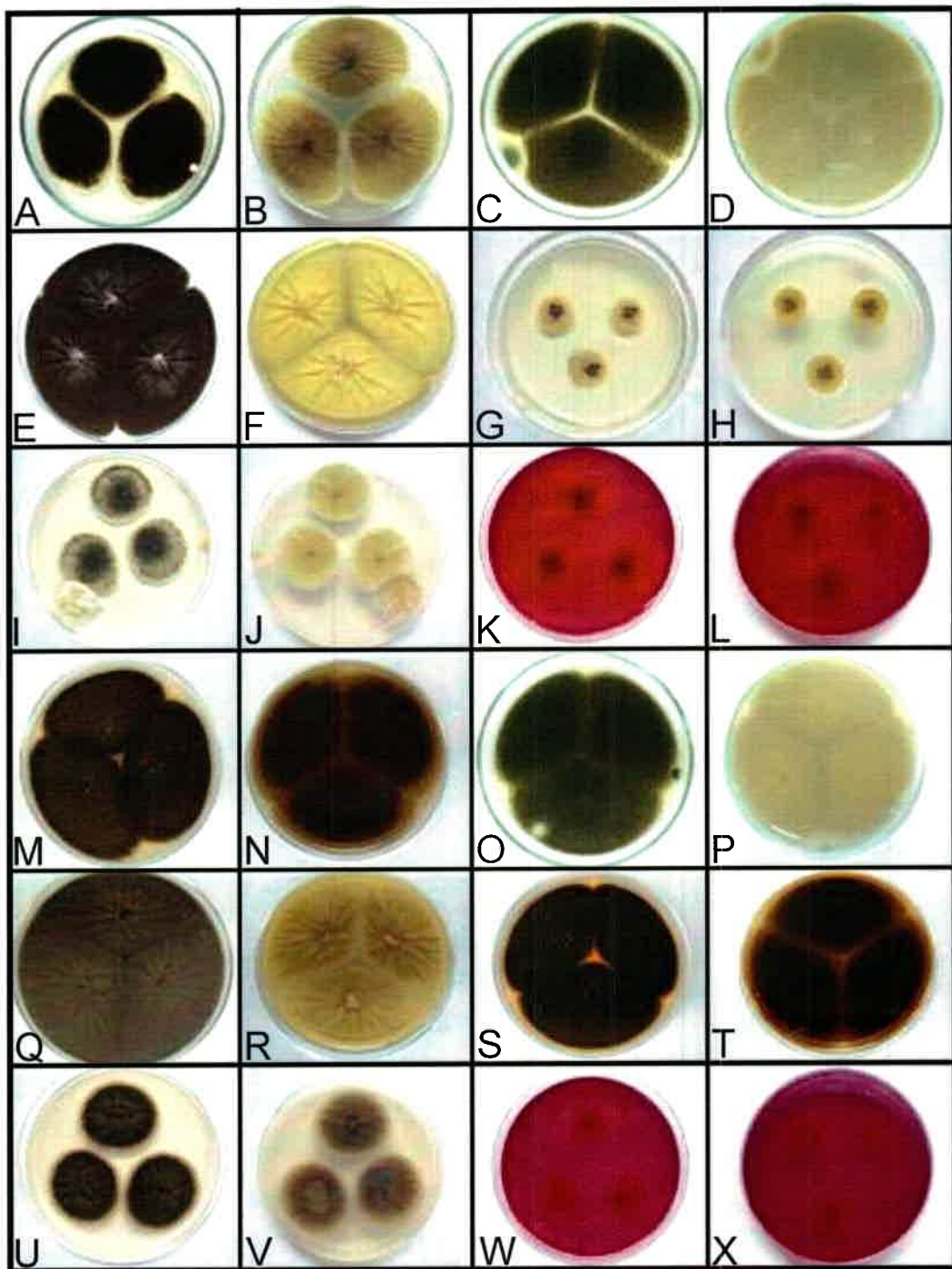


Figura V.10. Morfología de las colonias (anverso, reverso) de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* uniseriadas de referencia; *Aspergillus aculeatus* ITEM 7046 (A, B) CYA25; (C, D) MEA; (E, F) CY20S; (G, H) CYA37; (I, J) CZ; (K, L) CREA; *Aspergillus japonicus* ITEM 7034 (M, N) CYA25; (O, P) MEA; (Q, R) CY20S; (S, T) CYA37; (U, V) CZ; (W, X) CREA durante 7 días de incubación.

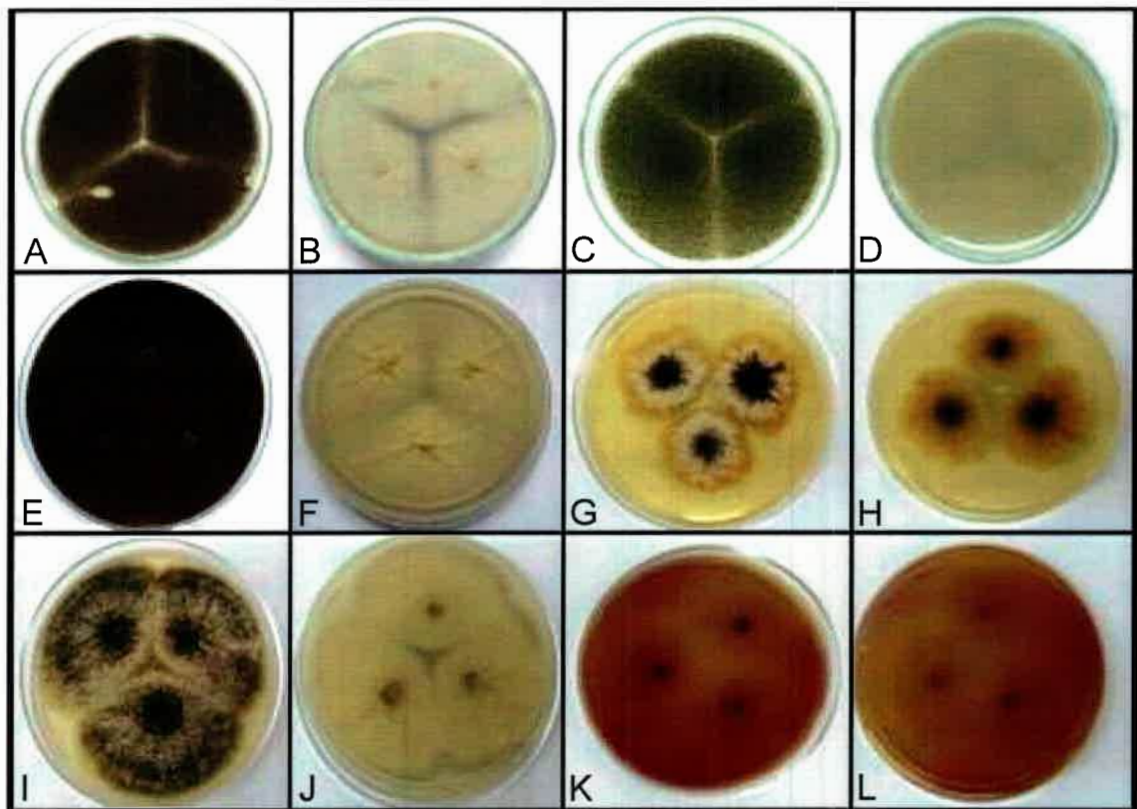


Figura V.10. Continuación. Morfología de las colonias (anverso, reverso) de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* uniseriadas de referencia; *Aspergillus uvarum* ITEM 4834 (A, B) CYA25; (C, D) MEA; (E, F) CY20S; (G, H) CYA37; (I, J) CZ; (K, L) CREA durante 7 días de incubación.

Las cepas uniseriadas ANRC 529, ANRC 530, ANRC 545 y ANRC 549 aisladas de pasas de uvas y la cepa ANRC 406 aislada de maní presentaron una macromorfología idéntica entre ellas aunque algo diferentes a las especies uniseriadas de referencia evaluadas en el presente estudio (comparar las Figuras V.2 con V.10). El anverso de la colonia en CYA 25° C de las 5 cepas presentaron una coloración marrón oscura en la periferia y crema en la zona central, esclerocios color crema a durazno, abundantes exudados hialinos y el reverso fue surcado radialmente con coloración amarillo clara. En CYA 37° C el anverso de la colonia presentó una coloración negra grisácea en el centro y salmón a anaranjado en la periferia, micelio surcado arrugado, pocos exudados hialinos y el reverso fue arrugado en el centro con coloración negro grisáceo y anaranjado en la periferia. En CY20S el anverso de la colonia fue arrugado y surcado de color marrón oscuro con tonalidades cremas, la textura del micelio fue aterciopelada con aspecto lanoso bajo lupa, el reverso resultó ser arrugado grueso de

color amarillo crema. En CREA se observó pobre crecimiento (esporulación fina y poco densa) y una mediana a buena producción de ácidos. La cepa ANRC 528 aislada de pasas de uvas presentó diferencias macromorfológicas en CYA a 25° C con respecto a las cepas anteriormente descritas. El anverso de la colonia presentó un micelio aterciopelado marrón, mientras que la zona central presentó aspecto lanoso grisáceo, no presentó esclerocios y el reverso de la colonia fue arrugado centralmente, surcado y de color crema amarillenta. En CY20S presentó características similares a lo observado en CYA a 25° C, excepto que el anverso fue de color marrón claro en la periferia y crema en el centro. En MEA, CYA a 37° C y CZ las características son las similares a las observadas en las otras 5 cepas uniseriadas descritas anteriormente. Las cepas ANRC 410, ANRC 426 y ANRC 429 aisladas de maní, evaluadas presentaron similares características de crecimiento entre ellas, pero con algunas diferencias a las de referencia evaluadas (comparar las Figuras V.3 con V.10). La macromorfología de éstas en el medio CZ fue muy similar en coloración y aspecto a la de la cepas de referencia de *A. uvarum* ITEM 4834 (comparar las Figuras V.3 con V.10). En CREA presentaron pobre crecimiento y nula producción de ácido. Samson y col. (2007) destacaron que las 4 especies uniseriadas conocidas hasta ese momento pueden distinguirse utilizando el medio CREA, donde *A. uvarum* presenta pobre crecimiento y limitada producción de ácido mientras que *A. japonicus* y *A. aculeatus* desarrollan bastante bien y presentan moderada producción de ácido. En contraste *A. aculeatinus* crece moderadamente y presenta buena producción de ácido. Es por esto que de acuerdo con las características observadas en los distintos medios de cultivo (superposición de características), no fue posible identificar, a nivel de especie, las cepas clasificadas morfológicamente como *Aspergillus* Uniseriados..

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, 5 cepas aisladas a partir de pasas de uvas y 4 aisladas de maní se clasificaron morfológicamente como *Aspergillus* Uniseriados (Abarca y col., 2004).

En la Tabla V.2 se detallan las características morfológicas observadas en CYA25 y MEA de 10 miembros del agregado *A. niger*, 2 cepas de *Aspergillus* Uniseriado y 1 cepa de *A. carbonarius* a fin de mostrar algunos de los caracteres tenidos en cuenta para distinguir morfológicamente a las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. Se describen 10 cepas del agregado *A. niger*, ya que fue el grupo donde se encontró mayor variabilidad morfológica, esto es de esperar ya que hasta el momento el agregado *A. niger* se encuentra formado por 10 especies (Varga y col., 2011).

En el presente estudio, las especies pertenecientes al agregado *A. niger* fueron el grupo de especies más frecuentemente aislado como contaminante en todos los sustratos analizados. En cambio, *A. carbonarius* y *Aspergillus* uniseriados sólo fueron aislados de pasas de uvas y maní en baja frecuencia. Estos datos concuerdan con los informados por varios autores que evaluaron la incidencia de *Aspergillus* Sección *Nigri* en diferentes sustratos incluyendo uvas y pasas de uvas (Magnoli y col., 2004; Chulze y col., 2006; Chiotta y col., 2009; Belli y col., 2004a; Romero y col., 2005; Bau y col., 2005; Palumbo y col., 2011), suelo de viñedos (Leong y col., 2007; Barberis y col., 2013), café (Taniwaki y col., 2003), maní (Magnoli y col., 2007, Palencia y col., 2009) cocoa (Copetti y col., 2010), entre otros.

Tabla V.2. Características morfológicas de diferentes especies de *Aspergillus* sección *Nigri* observadas en el presente estudio.

Especies	Forma conidios	Tamaño conidios	Textura	Tamaño de la vesícula (μm)	Diámetro en MEA (mm)	Color y textura en MEA	Diámetro en CYA 25 (mm)	Color y textura en CYA 25
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 703)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(40)-43-(48)	(55)-56-(57,5)	Marrón oscuro a negro, flocoso central, reverso no marcado.	(55)-56-(57,5)	Negro grisáceo con micelio blanco periférico, flocoso fino y levemente lanoso, reverso arrugado color crema.
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 702)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(35)-51.6-(60)	(40)-42-(44)	Negro a negro grisáceo, finamente flocoso, reverso no marcado	(53)-55-(57)	Marrón oscuro a negro, micelio blanco en la periferia, flocoso, reverso arrugado central (amarilla clara) y surcado radial (crema).
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 522)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(50,4)-55,7-(60)	(47,5)-48,7-(50)	Marrón oscuro, finamente flocoso, reverso no marcado.	(52)-55-(59)	Marrón oscuro, micelio flocoso a finamente flocoso, reverso arrugado central (crema grisáceo) y surcado radialmente (crema).



Tabla V.2. Continuación.

Especies	Forma conidios	Tamaño conidios	Textura	Tamaño de la vesícula (μm)	Diámetro en MEA (mm)	Color y textura en MEA	Diámetro en CYA 25 (mm)	Color y textura en CYA 25
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 602)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(55,2)-60,3-(67,2)	(47,5)-47,6-(48)	Marrón oscuro a negro, flocoso, reverso no marcado.	(52,5)-53,8-(55)	Negro, flocoso y espaciado, arrugado central continuando surcado (crema a crema grisácea).
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 603)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(52,8)-62-(66)	(44)-44,5-(45)	Negro, con micelio blanquecino, flocoso, reverso no marcado	(52)-55-(59)	Negro y blanco, flocoso y aterciopelado, reverso arrugado más compacto en el centro y amarillo grisáceo con bordes color crema.
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 517)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(48)-63,4-(72)	(43,5)-44,5-(46)	Marrón oscuro con leves tintes amarillentos, finamente flocoso, reverso no marcado	(55)-57-(60)	Marrón oscuro, flocoso central y finamente flocoso en la periferia, reverso arrugado y surcado (amarillo crema).

Tabla V.2. Continuación.

Especies	Forma conidios	Tamaño conidios	Textura	Tamaño de la vesícula (µm)	Diámetro en MEA (mm)	Color y textura en MEA	Diámetro en CYA 25 (mm)	Color y textura en CYA 25
agregado <i>A. niger</i> (ANRC 704)	Globosos	<5µm	Lisos a ligeramente rugosos	(45,6)-48-(50,4)	(47,5)-48-(50)	Negro y amarillo, micelio flocoso, reverso no marcado	(53,5)-55,6(60)	Negro central y micelio blanco amarillento, flocoso central continuando aterciopelado, reverso arrugado más compacto en el centro y gris con bordes surcados color crema
<i>Aspergillus</i> Uniseriado (ANRC 530)	Globosos a subglobosos	<5µm	Lisos a ligeramente rugosos	(36)-43-(50)	(44)-45,5-(47,5)	Marrón oscuro, micelio crema pegado al agar, finamente flocoso, reverso no marcado.	Crecimiento completo	Marrón oscuro en periferia y crema central, micelio aterciopelado periférico, reverso surcado radialmente amarillo claro.
<i>A. carbonarius</i> (ANRC 514)	Globosos	>7µm	Rugosos	(72)-76,8-(84)	(52)-55.1-(57)	Negro, micelio blanco en región central, flocoso, reverso no marcado.	(55)-55.3(56)	Negro, micelio blanco en periferia, flocoso, reverso arrugado central y surcado en periferia con coloración oscura y crema respectivamente.

Tabla V.2. Continuación.

Especies	Forma conidios	Tamaño conidios	Textura	Tamaño de la vesícula (μm)	Diámetro en MEA (mm)	Color y textura en MEA	Diámetro en CYA 25 (mm)	Color y textura en CYA 25
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 458)	Globosos	<5 μm	Lisos a ligeramente rugosos	(58,8)-63,3-(69,6)	(46)-47-(47,5)	Marrón oscuro a negro, con tonalidades blancas periféricas. Micelio flocoso central, menos denso en la periferia. Reverso no marcado.	(53)-53,5-(54)	Marrón oscuro a negro, con micelio blanco en la superficie. Micelio flocoso central y algodonoso en la periferia. Reverso arrugado compacto, marrón claro, con tonalidades en amarillo oro y crema.
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 415)	Globosos	<5 μm	Lisos	(34,8)-49-(58,8)	(37,5)-39-(40,5)	Marrón claro, con tonalidades blancas centrales. Micelio finamente flocoso. Reverso no marcado	(51)-54-(58)	Marrón claro a oscuro. Micelio aterciopelado. Reverso arrugado central y surcado en la periferia.
agregado A. <i>niger</i> (ANRC 446)	Globosos	<5 μm	Ligeramente rugosos	(34,8)-49-(58,8)	(46)-50,8-(56,5)	Marrón oscuro a negro con lana blanquecina a grisácea. Micelio flocoso y lanoso. Reverso no marcado	Crecimiento completo	Marrón oscuro a negro con lana blanquecina a grisácea. Micelio flocoso y lanoso. Reverso arrugado central y surcado, con pigmentos amarillos.

Tabla V.2. Continuación.

Especies	Forma conidios	Tamaño conidios	Textura	Tamaño de la vesícula (μm)	Diámetro en MEA (mm)	Color y textura en MEA	Diámetro en CYA 25 (mm)	Color y textura en CYA 25
<i>Aspergillus</i> Uniseriado (ANRC 410)	Globosos a subglobosos	<5 μm	Lisos a rugosos	(42)-55,2-(69,6)	Crecimiento completo	Marrón claro. Micelio finamente flocoso, pegado al agar. Reverso no marcado.	Crecimiento completo	Marrón oscuro a negro con micelio blanco. Micelio flocoso. Reverso arrugado central marrón verdoso y surcado en la periferia con tonalidades crema.

Los conidios de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* evaluadas de los diferentes sustratos se muestran en la Figura V.11. El tamaño de los conidios de las especies uniseriadas, agregado *A. niger* y *A. carbonarius* fue característico de cada especie y presentaron conidios de tamaño promedio a lo informado por otros autores (Tabla V.2) (Samson y col., 2007). En general, las especies de *A. carbonarius* producen conidios grandes (7 – 9 μm) al igual que otras especies, incluyendo *A. ibericus*, *A. homomorphus*, *A. sclerotiicarbonarius* y *A. sclerotioniger*. La mayoría de las otras especies producen conidios de tamaño que oscilan entre (2,5–) 3–4,5 (–5 μm). La ornamentación de los conidios es también característica en algunas especies, por ejemplo, *A. homomorphus* y *A. ibericus* producen conidios con apariencia espinosa, mientras que las otras especies producen conidios que presentan paredes lisas o casi lisas, incluyendo *A. vadensis* y *A. lacticoffeatus*. Sin embargo la ornamentación es un parámetro muy difícil de distinguir utilizando microscopía óptica no pudiendo diferenciarse los distintos tipos de rugosidades o bien si es rugoso o espinoso. Es por esto que informamos ornamentaciones lisas, lisas a ligeramente rugosas y rugosas.

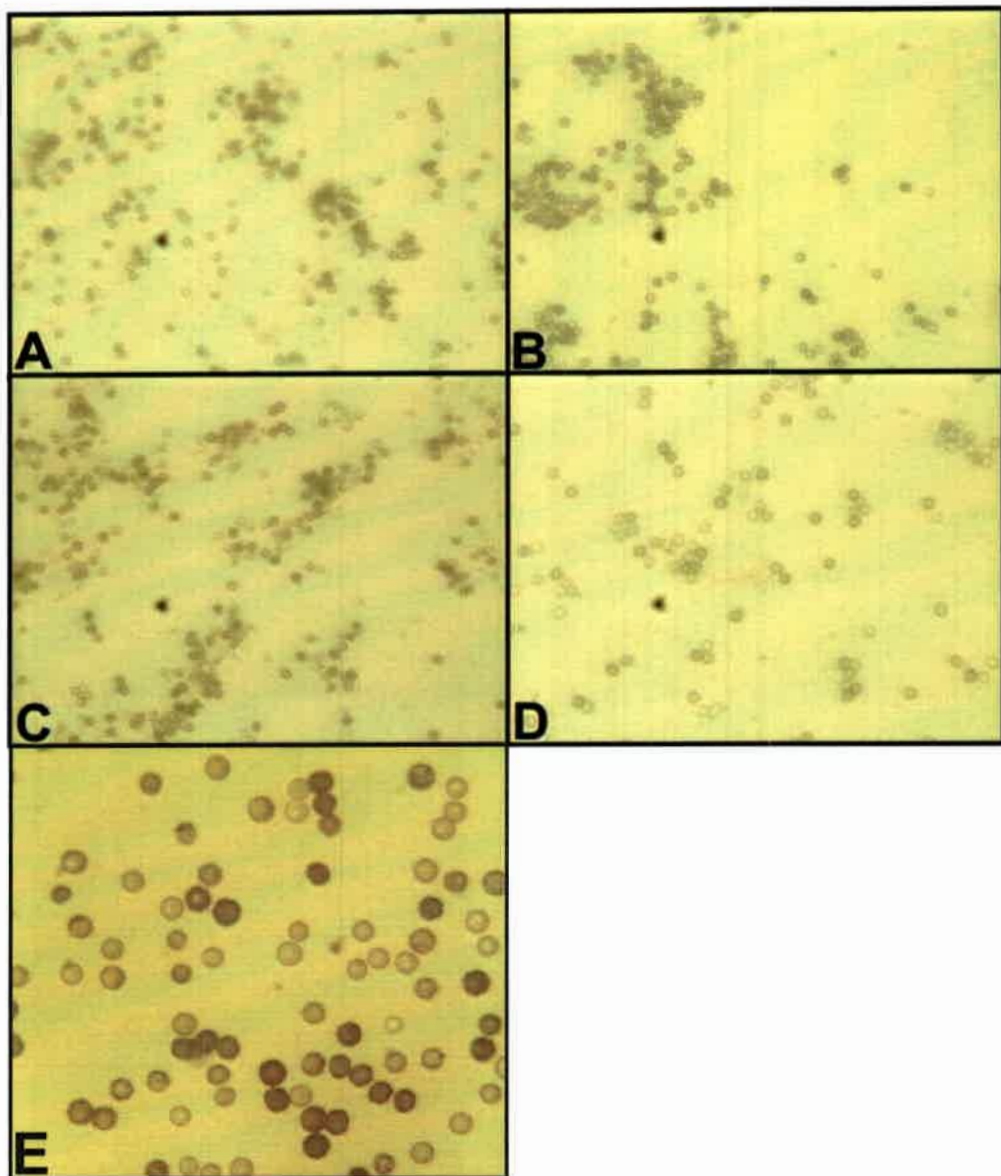


Figura V.11. Morfología de los conidios de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* desarrollados en el medio MEA a 25° C durante 7 días de incubación observados con un aumento de 400X. (A) agregado *A. niger* (ANRC 415), (B) agregado *A. niger* (ANRC 447), (C) agregado *A. niger* (ANRC 458), (D) *A. Uniseriata* (ANRC 429) y (E) *Aspergillus carbonarius* (ANRC 514).

V.2. Identificación de las cepas mediante métodos moleculares basados en PCR

Los avances en las técnicas de análisis del ADN han conducido al desarrollo de nuevos métodos para la caracterización y diferenciación de cepas tanto de hongos filamentosos como de otros organismos. La principal ventaja de los métodos de identificación basados en el ADN sobre los métodos de identificación fenotípica es que no están influenciados por las condiciones ambientales (Ness y col., 1993) y no dependen de la interpretación, a veces subjetiva, de características morfológicas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un salto cualitativo en el diagnóstico fúngico puesto que es una técnica rápida, específica y fácil de realizar. Además, debido a su alta sensibilidad requiere muy poca cantidad de ADN molde, permitiendo detectar moléculas diana en mezclas complejas. Por ello, está siendo utilizada para la detección y en algunos casos cuantificación directa de especies micotoxígenas y/o fitopatógenas (Edwards y col., 2002; Russell y Paterson, 2006; Niessen y col., 2007).

Para contrarrestar las limitaciones que se presentaron al utilizar criterios morfológicos en la identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, se consideró necesario usar criterios basados en el análisis del ADN ya que pueden proporcionar una información más objetiva.

En el presente trabajo se utilizaron cebadores específicos de especie a fin de identificar las distintas cepas clasificadas morfológicamente como uniseriados (*A. japonicus/A. aculeatus*), pertenecientes al agregado *A. niger* (*A. tubingensis* y *A. niger*) y como *A. carbonarius*. Esta identificación no permite la asociación directa con la producción de OTA, por lo tanto, el uso de cebadores para la detección de genes involucrados en la vía metabólica de la micotoxina podría ser más útil. Aunque, recientemente se han diseñados cebadores que permiten la identificación de cepas productoras (Castellá y col., 2011) los genes involucrados en la síntesis de OTA aún no han sido completamente identificados.

Las 194 cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes sustratos se estudiaron utilizando los cebadores descritos por Perrone y col. (2004) y Susca y col. (2007a). De las 157 cepas del agregado *A. niger* analizadas con los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2, 56 (35,7%) amplificaron un fragmento de 505 pb específico de *A. tubingensis*, 74 (47,1%) amplificaron un fragmento de 245 pb específico de *A. niger* y 27 cepas (17,2%) no pudieron ser identificadas usando dichos cebadores (Tabla V.3) (Figura V.12).

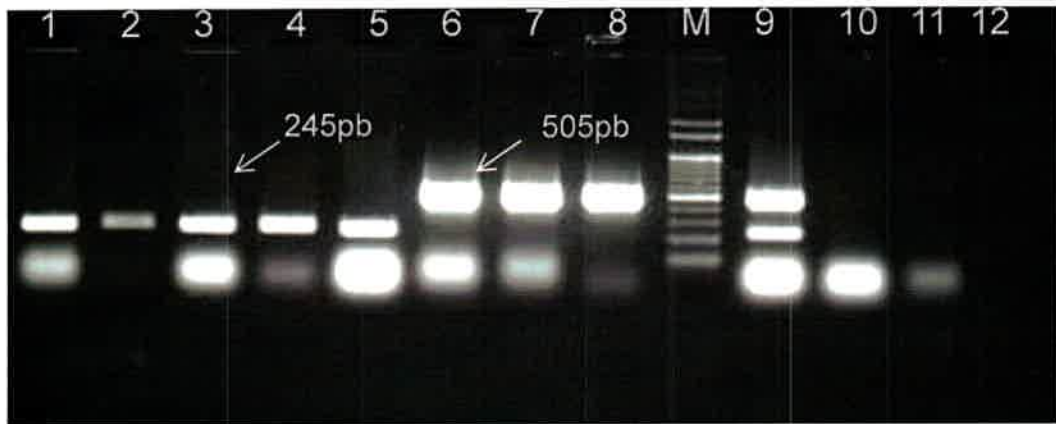


Figura V.12. Identificación rápida de *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubingensis* usando los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2 (Múltiple PCR). Líneas 1-5: agregado *A. niger* (cepas ANRC 521, 300, 304, 602, 403); Líneas 6-8: agregado *A. niger* (cepas ANRC 518, 520, 301); M: Marcador de peso molecular (Marcador DNA Ladder Bio Labs New England Inc); Línea 9: control positivo con *A. niger* ITEM 4501 y *A. tubingensis* ITEM 4845; Línea 10: *A. japonicus* ITEM 7034; Línea 11: *A. carbonarius* FRR 5690; Línea 12: control negativo sin ADN.

Debido a que *A. niger* es conocido por producir OTA, su correcta identificación dentro del agregado *A. niger* es muy importante para evitar una sobreestimación de los riesgos de contaminación y toxicológicos. A pesar de esto, la identificación de las especies dentro del agregado *A. niger* sigue siendo controversial. Varga y col., (2011) realizaron una revisión de la sección *Nigri* donde describieron dos nuevas especies dentro del agregado *A. niger*: *A. neoniger* y *A. eucalypticola*, además reclasificaron a *A. foetidus* y *A. lacticoffeatus* como sinónimos de *A. niger*, y a *A. coreanus* como sinónimo de *A. acidus* (anteriormente clasificado como *A. foetidus* var. *acidus*; actualmente denominado *A. luchuensis*). Usando secuencias de genes conservados, hasta el momento, dentro del agregado *A. niger* se han descrito 10 especies biseriadas divididas en tres subgrupos: *A. tubingensis*, *A. niger* y *A. brasiliensis*.

Tabla V.3. Número de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes sustratos que fueron identificadas mediante cebadores específicos de especie^a.

Sustrato	Uniseriados		Biseriados			<i>A. carbonarius</i>	
	<i>A. japonicus</i> / <i>A. aculeatus</i>	PCR negativa	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	PCR negativa	<i>A. carbonarius</i>	PCR negativa
Almendra	-	-	11 (84,6%)	2 (15,4%)	-	-	-
Café	-	-	-	2 (40%)	3 (60%)	-	-
Maní	4 (100%)	-	18 (31,6%)	26 (45,6%)	13 (22,8%)	-	-
Pasas de uvas	5 (100%)	-	23 (62,2%)	7 (18,9%)	7 (18,9%)	21 (91,3%)	2 (8,7%)
Pimienta	-	-	-	6 (100%)	-	-	-
Residuos de cervecería	-	-	-	2 (100%)	-	3 (100%)	-
Soja	-	-	1 (3,5%)	24 (82,7%)	4 (13,8%)	-	-
Suelo	-	-	-	3 (100%)	-	2 (100%)	-
Uvas	-	-	3 (60%)	2 (40%)	-	-	-
TOTAL	9 (100%)	-	56 (35,7%)	74 (47,1%)	27 (17,2%)	26 (93%)	2 (7%)

%- Porcentaje de reacciones positivas o negativas en los diferentes sustratos teniendo en cuenta *Aspergillus* Uniseriados, Biseriados y *A. carbonarius*. a-Perrone y col. (2004) y Susca y col. (2007a).

Debido a que en varios estudios llevados a cabo en Argentina, las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* no han sido caracterizadas por técnicas moleculares, no se conoce aun en profundidad la distribución de las especies en los alimentos y productos derivados y la importancia de su incidencia natural, factores importantes para evaluar la posibilidad de contaminación con ocratoxina A. A pesar de que los datos son escasos, recientemente Chiotta y col. (2011) y Barberis y col. (2013) evaluaron cepas aisladas de uvas y suelo de viñedos en Argentina mediante diferentes marcadores moleculares encontrando a *A. tubingensis* como la especie más frecuente dentro del agregado *A. niger* con un porcentaje de aislamiento del 82,9 y 89%, respectivamente. Estos datos concuerdan con el presente estudio ya que la especie *A. tubingensis* fue encontrada con mayor frecuencia en todos los sustratos analizados, a excepción del sustrato soja donde sólo se aisló un 3,5% (Tabla V.3).

Las 27 cepas (17,2%) pertenecientes al agregado *A. niger* que no amplificaron con los cebadores específicos TUB1/TUB2 y NIG1/NIG2, podrían representar alguna especie relacionada dentro del grupo *A. niger*. Puesto que los cebadores diseñados por Susca y col. (2007a) no diferencian todas las especies pertenecientes al agregado *A. niger*, sería necesario utilizar una técnica de *DNA Fingerprinting* para evaluar la similitud genética de estas cepas en comparación con cepas de referencia o bien usar datos de secuenciación de los genes β -tubulina y/o calmodulina para dilucidar la identidad de las mismas.

Las 9 cepas uniseriadas amplificaron el fragmento específico de 583 pb usando los cebadores JAPO1/JAPO2 (Tabla V.3) (Figura V.13). Dichos cebadores no son específicos de especies, es decir, no distinguen a todas las especies uniseriadas. Estos cebadores fueron diseñados a partir de secuencia parcial del gen de la calmodulina (Perrone y col., 2004) cuando sólo habían sido descritas dos especies dentro de este grupo, *A. japonicus* y *A. aculeatus*, y para muchos investigadores eran considerados la misma especie puesto que no podían diferenciarse por algunas técnicas moleculares (*DNA fingerprinting*; análisis de la región ITS, entre otros) (Parenicova y col., 1997; Varga y col., 2000). Actualmente, se han descrito ocho nuevas especies dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* Uniseriados: *Aspergillus uvarum* (Perrone y col., 2008), *Aspergillus aculeatinus* (Nooim y col., 2008), *Aspergillus fijiensis*, *Aspergillus indologenus*, *Aspergillus violaceofuscus* (Varga y col., 2011), *Aspergillus saccharolyticus* (Sørensen y col., 2011), *Aspergillus floridensis* y *A. trinidadensis* spp. nov (Jurjević y col., 2012).



Figura V.13. Identificación rápida de *Aspergillus japonicus*/*A. aculeatus* y *Aspergillus carbonarius* usando los cebadores JAPO1/JAPO2 y CARBO1/CARBO2. Línea 1-4: *Aspergillus* uniseriados (cepas ANRC 530, 528, 529, 406); Línea 5: *A. japonicus* ITEM 7034; Línea 6: *A. aculeatus* ITEM 7046; Línea 7: *A. uvarum* ITEM 4834; Línea 8: *A. tubingensis* ITEM 4845; Línea 9: *A. carbonarius* FRR 5690; Línea 10: control negativo sin ADN; Línea M: Marcador de peso molecular (Marcador DNA Ladder Bio Labs New England Inc); Líneas 12-15: *A. carbonarius* (cepas ANRC 501, 514, 601, 600); Línea 16: *A. carbonarius* FRR 5690; Línea 17: *A. tubingensis* ITEM 4845; Línea 18: *A. japonicus* ITEM 7034; Línea 19: *A. niger* ITEM 4501; Línea 20: control negativo sin ADN.

Morfológicamente, *A. uvarum* está estrechamente relacionada con *A. japonicus*, sin embargo su velocidad de crecimiento, particularmente en CYA a 37° C, la separa de esta especie y de *A. aculeatus* (Perrone y col., 2008), y ha sido aislada a partir de uvas de diferentes países del área del Mediterráneo (Francia, Portugal, Italia, España, Israel y Grecia) y aire de ambientes externos e internos en Estados Unidos (Jurjević y col., 2012). *Aspergillus aculeatinus* ha sido aislado únicamente de granos de café arábica del norte de Tailandia y granos de café Robusta del sur del mismo. Morfológicamente, *A. aculeatinus* puede distinguirse por la forma y el tamaño de los conidios, los cuales son subglobosos a elipsoidales y más pequeños (2-5 μm) en comparación con los de *A. aculeatus* / *A. japonicus* (Noonim y col., 2008). Debido a la gran diversidad de especies recientemente descrita dentro de las especies uniseriadas, sería importante poder identificar a nivel de especie los nueve aislamientos del presente trabajo.

Debido a lo anteriormente expuesto, sería necesario utilizar una técnica de *DNA fingerprinting* para evaluar la similitud genética de estas cepas en comparación con cepas de referencia o bien usar datos de secuenciación de los genes β -tubulina y/o calmodulina para dilucidar la identidad de estas cepas identificadas morfológicamente

como uniseriadas y que amplificaron un producto de 583 pb con los cebadores JAPO1/JAPO2.

Aunque *A. carbonarius* presenta caracteres morfológicos distintivos que son fácilmente identificables a través de una evaluación microscópica (tamaño de los conidios entre 7 y 9 μm), el uso de cebadores específicos, pueden agilizar el proceso de identificación y hacerlo más objetivo. De las 28 cepas identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* aisladas de pasas de uvas, residuos de cervecera y suelo, que fueron analizadas con los cebadores CARBO1/CARBO2, 26 cepas (93%) amplificaron un fragmento de 371 pb específico de *A. carbonarius* (Figura V.13). Las cepas ANRC500 y ANRC547 identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* (biseriadas, presencia de conidios mayores a 5 μm) no mostraron una respuesta positiva usando los cebadores específicos (Tabla V.3).

Varias especies de *Aspergillus* sección *Nigri* producen conidios grandes (6–9 μm) incluyendo *A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. homomorphus*, *A. sclerotii carbonarius* y *A. sclerotioniger* (Samson y col., 2007). De ellas, sólo *A. carbonarius* y *A. ibericus* se han aislados a partir de uvas y suelo (Perrone y col., 2007), por lo que las cepas ANRC547 y ANRC500 aisladas de pasas de uvas podrían representar alguna otra especie relacionada. *Aspergillus ibericus* es fenotípicamente muy similar a *A. carbonarius* y sólo pueden diferenciarse a través de caracteres moleculares y perfil de extrolitos (Serra y col., 2006). Hasta el momento, *A. ibericus* ha sido aislado sólo a partir de uvas y pasas de uvas del Área del Mediterráneo (Serra y col., 2006), posiblemente debido a que su identificación se basa principalmente en análisis de las secuencias del gen de calmodulina. Por lo tanto, para dilucidar la identidad de estas dos cepas identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* y que no amplificaron con los cebadores CARBO1/CARBO2, sería necesario usar un marcador de ADN que permitiera evaluar las similitudes genéticas con cepas de referencia o bien usar secuenciación de genes conservados.

V.3. Análisis de metabolitos secundarios

V.3.1. Determinación del potencial ocratoxicogénico de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*

En los últimos años se ha estudiado ampliamente la capacidad de producción de OTA por las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, encontrándose informes ambiguos sobre la toxigenicidad y el porcentaje de cepas toxigénicas de las diferentes especies. Dentro de las especies pertenecientes al agregado *A. niger* y de *A. carbonarius* el porcentaje de cepas productoras es variable, del 0,6 al 50% y del 70 al 100%, respectivamente, así como los niveles de toxina producida (Abarca y col., 1994, 2004; Wicklow y col., 1996; Battilani y col., 2006; Perrone y col., 2006a, 2007). Algunos estudios informan que las cepas de *A. japonicus* son capaces de producir OTA, pero aún no ha sido confirmado (Dalcero y col., 2002; Battilani y col., 2003a). Dicha variabilidad podría deberse a una incorrecta delimitación de especies, ya que la mayoría de las especies pertenecientes al agregado *A. niger* y especies uniseriadas sólo se diferencian por métodos moleculares, lo mismo puede ocurrir dentro de la Serie Carbonaria puesto que recientemente se ha descrito a *A. ibericus* como un miembro morfológicamente similar a *A. carbonarius* pero incapaz de producir OTA. Además, la variabilidad puede ser atribuida al diferente número de cepas evaluadas, condiciones de producción ya sea medio sintético, temperatura, tiempo de incubación, entre otros factores.

Debido a que en un estudio previo se había encontrado dos cepas identificadas molecularmente como *A. carbonarius* (ANRC 601 y ANRC 600) que habían producido niveles bajos y nulos de OTA, utilizando la metodología propuesta por Bragulat y col. (2001) y usando CYA como medio de cultivo (Barberis M, comunicación personal), y teniendo en cuenta que Chiotta y col. (2011) mostraron que las cepas de *A. carbonarius* que no fueron productoras de OTA en medio CYA fueron capaces de producir dicha micotoxina en los medios PDB y YES, es que se decidió evaluar la producción de dicha micotoxina en el medio YES según la metodología propuesta por Teren y col. (1996) con algunas modificaciones descritas en el punto III.4.2. Las cepas aisladas de suelo de viñedos (ANRC 601 y ANRC 600) fueron incubadas a 30° C por 7 y 10 días, en las relaciones Vol. Medio/ Vol. de Recipientes de 1/4 y 1/5. Los resultados se muestran en la Figura V.14.

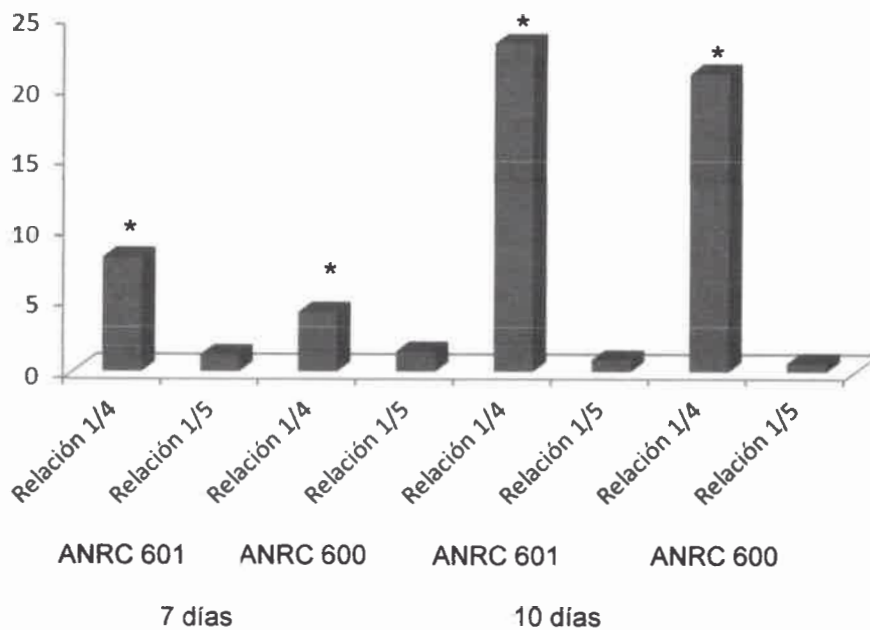


Figura V.14. Producción de OTA ($\mu\text{g/ml}$) de dos cepas de *Aspergillus carbonarius* (ANRC 601; ANRC 600) en la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4 y 1/5, incubado a 30°C por 7 y 10 días. * Diferencia significativa ($p < 0,05$).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), con respecto a la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente, siendo los mayores niveles de OTA producidos en la relación 1/4. A partir de dichos resultados, se decidió utilizar esta relación para las demás determinaciones. Esto podría deberse a una disminución en los niveles de oxígeno, llevando a niveles superiores de este metabolito secundario en la menor relación Vol. Medio/Vol. Recipiente. Valero y col. (2008) evalúan el crecimiento y producción de OTA en medio sintético de jugo de uva (SNM) empaquetados en combinaciones de niveles O_2 (1% - 5%- 20%) y de CO_2 controlados (0 %-15 %), además de aire como control. Los autores observaron reducciones en la tasa de crecimiento en 1% de O_2 seguido de 1% de O_2 / 15 % de CO_2 , mientras que un 5 % O_2 estimulaba el crecimiento de todos los aislados. En cuanto a la producción de OTA, observaron que el efecto de las distintas atmósferas varía según la cepa y además demostraron que en *A. carbonarius* y *A. niger* la producción disminuyó en la condición de 1% O_2 /15% CO_2 y 1% de O_2 , respectivamente, después de 7 días de incubación.

Una vez elegido el medio YES y la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4, se determinó la producción de OTA de las 19 cepas de referencia (**punto III.1**) variando la temperatura (15, 25, 30 y 35° C) y el tiempo de incubación (7 y 10 días) a fin de optimizar las condiciones de producción más apropiadas.. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.15.

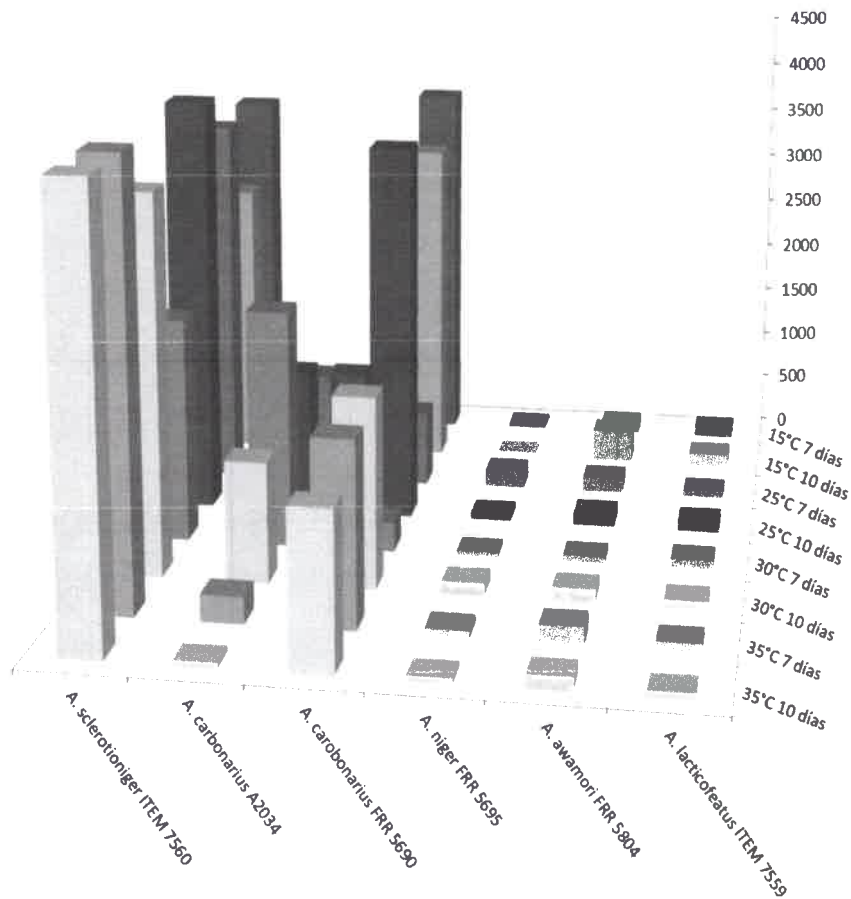


Figura V.15. Niveles de producción de OTA (ng/ml) a diferentes temperaturas y tiempos en la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4.

Las cepas de referencia pertenecientes al agregado al *A. niger* (ITEM 7559; FRR 5804; FRR 5695) produjeron OTA con un valor promedio de 98 ng OTA/ml de medio, mientras que las cepas pertenecientes a la serie Carbonaria (A2034; FRR5690; ITEM 7560) produjeron niveles promedios de 2024 ng OTA/ml de medio. En la figura V.15 se observa claramente que la producción de OTA por estas especies ocurrió en todo el rango de temperaturas evaluadas (15 - 35°C) lo cual indica que podría existir un peligro potencial de contaminación por OTA si las condiciones de almacenamiento de las materias primas o sustratos no son las adecuadas. No hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a los tiempos y temperaturas ensayados.

Astoreca y col. (2007) evaluaron la influencia de los factores ecofisiológicos sobre la producción de OTA por seis cepas del agregado *A. niger* aislados de semillas de maní, granos de maíz y granos de café, y dos cepas de *A. carbonarius* aisladas de pasas de uvas de Argentina. Dichos autores observaron que la temperatura óptima para la producción de OTA fue de 25° C para todas las cepas perteneciente al agregado *A. niger*, mientras que las cepas *A. carbonarius* produjeron los más altos niveles de OTA a 25 y 30° C, sin diferencias significativas en los perfiles de producción entre estas cepas.

En algunos casos el contenido de OTA disminuyó considerablemente a mayor tiempo de incubación, esta disminución no es lo esperado porque la toxina es un metabolito estable (Figura V.15). Algunos autores han sugerido que esto podría deberse al hecho de que las cepas pueden eliminar y asimilar la porción fenilalanina de la OTA cuando se agotan las fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo (Teren y col., 1996; Marín y col., 2006), lo cual no sucedería a campo puesto que existiría una abundante fuente de nutrientes.

Luego, se determinó la capacidad toxicogénica de 52 cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* (4 cepas de *Aspergillus* uniseriados, 32 pertenecientes al agregado *A. niger* y 16 *A. carbonarius*). Se observó que las cepas de *A. carbonarius* fueron las únicas capaces de producir OTA, de las 16 cepas evaluadas sólo una (ANRC 500) no produjo dicha micotoxina. La cepa ANRC 500 fue clasificada morfológicamente como *A. carbonarius* pero no amplificó el producto correspondiente usando los cebadores CARBO1/CARBO2, por lo que estudios moleculares como la secuenciación de regiones conservadas ayudarían a dilucidar si realmente dicha cepa es *A. carbonarius* o una especie relacionada. Dentro de las 15 cepas productoras, no se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto a la producción de OTA con respecto a las diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Por lo tanto, se

determinó que las condiciones adecuadas más simples para la producción de OTA deberían ser 25° C por 7 días (Figura V.16.). Dichas condiciones fueron las elegidas para analizar la producción de la micotoxina de las demás cepas. Esto demuestra que las condiciones óptimas para la producción de OTA varía dependiendo de la cepa ensayada, estos resultados también fueron encontrados por Michell y col. (2004).

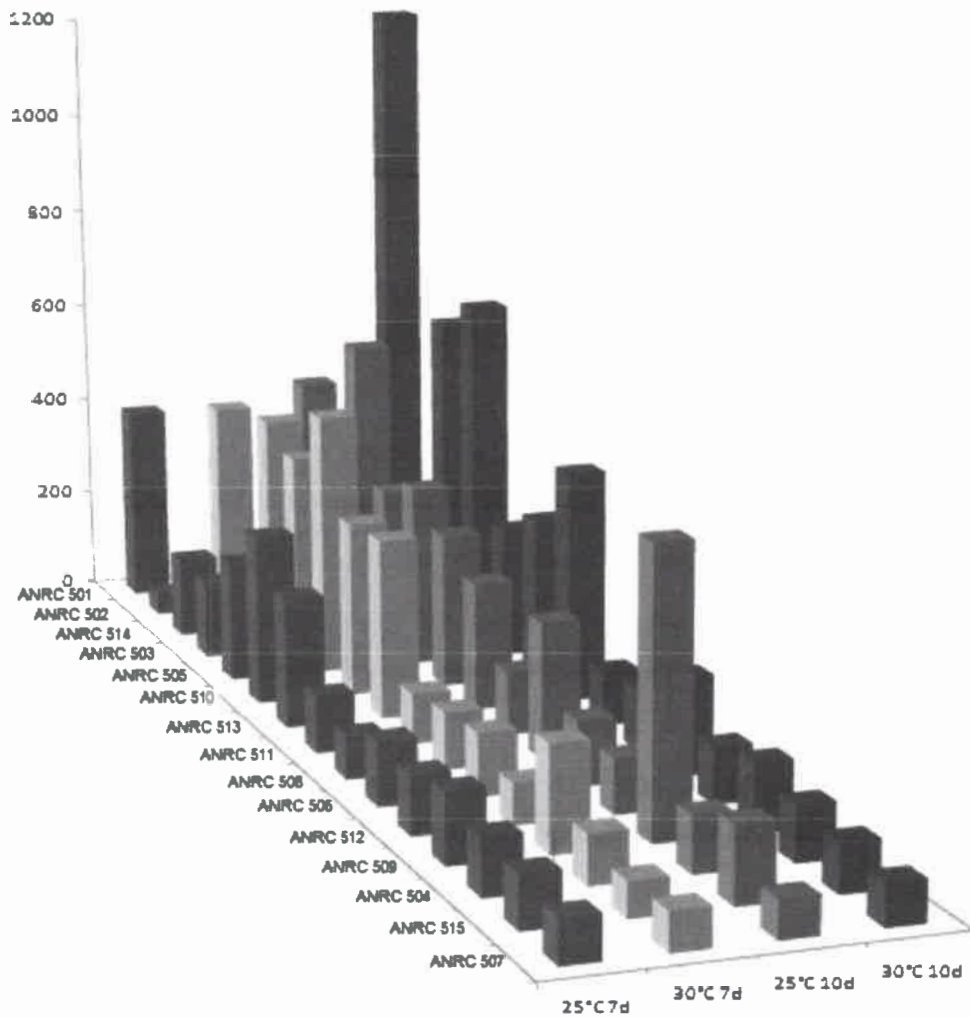


Figura V.16. Niveles de producción de OTA (ng/mL) a diferentes temperaturas y tiempos en la relación Vol. Medio/Vol. Recipiente 1/4.

Luego se determinó el potencial toxicogénico de la totalidad de las cepas evaluadas: 157 cepas clasificadas morfológicamente como pertenecientes al agregado *A. niger*, 9 cepas uniseridas y 28 cepas de *A. carbonarius*, usando las condiciones seleccionadas anteriormente (25° C por 7 días de incubación). Sólo un miembro del agregado *A. niger* (0,63%) (ANRC 104, aislado de soja) fue capaz de producir OTA (144,7 ng/ml de YES), siendo en este caso el agregado *A. niger* de bajo riesgo toxicogénico. Abarca y col. (1994, 2004), Wicklow y col. (1996) y Perrone y col. (2007) informan que entre las especies incluidas en el agregado *A. niger* el porcentaje de cepas productoras varía de 0,6 a 50%. Mientras que de las 28 cepas de *A. carbonarius* sólo tres (ANRC 500, ANRC 547 y ANRC 559) no fueron capaces de producir dicha micotoxina. Cabe aclarar que de estas tres cepas, sólo la ANRC 559 amplificó el producto específico usando los cebadores CARBO1/CARBO2, por lo que la secuenciación de regiones conservadas del genoma o el análisis a través de marcadores ISSR, ayudaría a dilucidar si realmente las cepas en conflicto podrían ser *A. ibericus* o una especie relacionada.

Por otro lado, es poco frecuente encontrar cepas de *A. carbonarius* en ambientes naturales que no sean capaces de producir OTA, tal es el caso de la ANRC 559. Diversos estudios han descrito cepas identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* no capaces de producir OTA (Da Rocha Rosa y col., 2002; Battilani y col., 2003; Taniwaki y col., 2003). Por ejemplo, Bau y col. (2005) encontraron que 4 de 123 cepas clasificadas morfológicamente como *A. carbonarius* aisladas de pasas de uvas no produjeron OTA. Más tarde, Serra y col. (2006) demostraron a través de marcadores AFLP y secuenciación de genes conservados del genoma (calmodulina y región ITS), que dichas cepas pertenecían en realidad a otra especie diferente de *Aspergillus* sección *Nigri* que la llamaron *A. ibericus*.

Recientemente una cepa de *A. carbonarius* mutante no ocratoxicogénica ha sido obtenida por la inactivación de un gen que codifica un péptido sintetasa no ribosomal en una cepa salvaje productora de OTA de *A. carbonarius*, dando una nueva e interesante visión de la ruta biosintética de esta micotoxina (Gallo y col., 2012).

En el presente estudio se observa que *A. carbonarius* es la principal especie responsable de la acumulación de OTA en pasas de uvas y residuos de cervecería, ya que el 89% de las cepas evaluadas resultaron ser productoras de dicha toxina, con niveles que variaron de 42 a 389 ng/ml con una media de 161 ng/ml bajo las condiciones ensayadas. Diversos estudios han demostrado que *A. carbonarius* es la principal especie responsable de la presencia de OTA en productos alimenticios tales

como, vino, uvas o frutas secas (Cabañes y col., 2002; Da Rocha Rosa y col., 2002; Battilani y Pietri 2002; Magnoli y col., 2003; Leong y col., 2007b). No se sabe por qué el porcentaje de cepas productoras de OTA en *A. carbonarius* puede alcanzar el 100%, mientras que el porcentaje es mucho más bajo para las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* (Abarca y col., 2004). La incapacidad para producir OTA puede ser causada por la presencia de genes silenciados o por mutaciones en genes funcionales o reguladores (Frisvad y col., 2007). Sin embargo, la ruta biosintética de OTA aún no ha sido completamente dilucidada en detalle. Hasta el momento, sólo se han relacionado algunos genes de la policétido sintetasa (involucrados en el pasos iniciales de la vía) y un péptido sintetasa no ribosomal con el cluster de genes biosintéticos (Gallo y col., 2012). Además, la capacidad de producir OTA es una propiedad inherente en dicha especie y por esta razón, es muy poco frecuente encontrar cepas de *A. carbonarius* no toxicógenas en sustratos naturales. Recientemente, Cabañes y col. (2012) describieron por primera vez tres cepas de *A. carbonarius* no toxicogénicas a través de una caracterización profunda (incluyendo secuenciación de los genes ITS-5.8S rRNA, β -tubulina y calmodulina) y las compararon con otras las cepas ocratoxigénicas de la misma especie. Además, evaluaron los genes de la policétido sintasa (PKS), ya que se conoce que participan en la biosíntesis de OTA. La importancia en estas cepas radica en que podrían ser útiles como agentes biotecnológicos en la industria alimentaria o también podrían ser utilizados como agentes biológicos para el control de la producción de OTA en viñedos y otros cultivos. Es por este motivo que fue de fundamental importancia poder caracterizar profundamente a la cepa ANRC559, que no fue capaz de producir OTA en las condiciones de estudio y que además amplificó el producto específico con los cebadores específicos de *A. carbonarius*. Cuando se profundizó su estudio para evaluar producción en distintos medios, desafortunadamente se encontró que dicha cepa producía OTA en otras condiciones de ensayo (CYA 25°C- 7 días)

Algunos autores han informado la producción de OTA por *A. japonicus* pero esto aún no ha sido confirmado (Dalcero y col., 2002; Battilani y col., 2003; Ponsone y col., 2007; Magnoli y col., 2007). Dichos resultados no concuerdan con nuestros estudios ya que ningún aislado identificado como *Aspergillus* uniseriado (9 cepas), fue capaz de producir niveles detectables de OTA.

IV.3.2. Determinación de la producción de Fumonisina B₂ por los miembros de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Frisvad y col. (2007) detectaron por primera vez la producción de FB₂ por cepas de *A. niger*. Dicha micotoxina es producida por especies del género *Fusarium*, principalmente por *F. verticillioides*, aunque recientemente se ha informado la producción de fumonisinas por tres cultivos de *A. niger* con importancia industrial (genomas completamente secuenciados). *Fusarium verticillioides* produce fumonisina B₁, B₂, y B₃ sobre medios a base de extractos de plantas (malta de cebada, avena, arroz, patatas y zanahorias). En cambio, en *A. niger* se observa mayor producción en medios con baja actividad de agua incluyendo agar Czapek autolisado de levadura con 5% de NaCl y CY20S entre otros, siendo mayor en este último. Originalmente la principal diferencia entre la producción de fumonisinas por *A. niger* y *F. verticillioides* es que las cepas de *A. niger* producían solo FB₂. Posteriormente, se demostró la producción de FB₄ en niveles de un 10-25% de la FB₂ por *A. niger* (Nielsen y col., 2009; Noonim y col., 2009). Recientemente Mansson y col. (2010) determinaron la producción de FB₆ por intercambio catiónico y cromatografía de fase inversa, a partir de cultivos *Aspergillus niger* NRRL 326.

Aspergillus niger es una especie abundante de gran incidencia tecnológica en la producción de ácido cítrico, enzimas extracelulares, y también como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas. Ciertas cepas de *A. niger* producen tanto OTA como FB₂, por lo que, los alimentos contaminados con dichas especies podrán potencialmente contener ambas micotoxinas carcinógenicas (Frisvad y col., 2011).

En el presente estudio, se determinó la capacidad de producir FB₂ de las 86 cepas del agregado *A. niger* (74 cepas de *A. niger*/*A. welwitschiae*, 4 *A. tubingensis* y 2 *A. acidus*) (Tabla V.4). Además, se usó como control positivo a la cepa *A. welwitschiae* ITEM 4502 conocida como productora de dicha micotoxina (Susca y col., 2010).

La cepa de referencia, *A. welwitschiae* ITEM 4502, produjo FB₂ (0,85 µg FB₂/g CY20S) mientras que *A. tubingensis* y *A. acidus* aisladas en el presente estudio no fueron capaces de producir dicha micotoxina. De las 74 cepas de *A. niger*/*welwitschiae* evaluadas, sólo 4 (5,4%) produjeron niveles detectables de FB₂ (0,32 - 5 µg FB₂/g CYA20S); sólo 1 (ANRC104) además produjo OTA (Tabla V.4). Resultados similares fueron encontrados por Susca y col. (2010), quienes informaron que la única

especie productora de FB₂ fue *A. niger* y que de las 32 cepas de *A. niger* analizadas, 9 (28%) fueron productoras en niveles de 0,1 a 293 ug/g.

Tabla V.4. Producción de FB₂ de cepas pertenecientes al agregado *A. niger* aisladas de diferentes sustratos.

Sustrato	Origen	Cepas	Fumonisina B ₂ (ug/g)
Suelo	Serrano (Córdoba)	ANRC 602	0,5
Pasas de uvas	San Juan	ANRC 524	5
Soja	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 104	1
Maní	Las Acequias (Córdoba)	ANRC 407	0,32

El descubrimiento reciente de la capacidad de producción de fumonisinas por cepas de *A. niger*, ha alertado sobre la presencia de estas micotoxinas tanto en uvas como en pasas de uva u otros productos, donde dicha especie es un contaminante frecuente. Mogensen y col. (2009) evaluaron la capacidad de producir FBs por cepas pertenecientes al agregado *A. niger* aisladas de uvas y pasas de uvas. Los autores mostraron que ninguna de las cepas de *A. tubingensis* y *A. acidus* (= *A. luchuensis*) analizadas fueron capaces de producir FBs pero el 77% de las cepas de *A. niger* evaluadas produjeron FB₂ (rango= 5–7841 µg/kg) y FB₄ (rango= 12–6476 µg/kg) aunque no produjeron niveles detectables de OTA.

Recientemente, Chiotta y col. (2011) evaluaron la capacidad de producir FB₂ y FB₄ de 14 cepas de *A. niger* aisladas de uvas de Argentina, encontrando que el 35,7% produjeron dichas micotoxinas. Los niveles de producción de FB₂ y FB₄ oscilaron entre 0,2 y 17,4 µg/g y, 0,07 y 7 µg/g, respectivamente; solo una cepa de las 14 evaluadas produjo además OTA. Por otro lado, ninguno de los otros miembros de la sección fue capaz de producir niveles detectables de fumonisinas.

Posteriormente se confirmó mediante HPLC MS/MS la producción de FB₂ de las cepas ANRC602, ANRC524 y ANRC104 (aisladas de suelo, pasas de uvas y soja) en base al tiempo de retención y al precursor [M + H]⁺ de 706 amu y ambos productos iónicos (336 y 318 amu).

V.4. Evaluación de la diversidad genética de *Aspergillus* sección *Nigri* a través del uso de marcadores neutros, Secuencias Intergénicas Simples Repetidas (ISSRs)

A fin de encontrar un marcador molecular para evaluar la diversidad genética de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, se procedió a la optimización del protocolo de los marcadores ISSR. Para ello, se analizaron 3 cepas anteriormente identificadas por secuenciación del gen de la calmodulina (*A. welwitschiae* ANRC524; *A. ibericus* ANRC500, *A. luchuensis* ANRC703) y 6 cepas de referencia (*A. japonicus* ITEM 7034; *A. aculeatus* ITEM 7046; *A. uvarum* ITEM 4834; *A. niger* FRR 5695; *A. tubingensis* ITEM 4845; *A. carbonarius* A2034).

Los 15 cebadores utilizados en el presente estudio fueron evaluados por su capacidad de producir patrones de bandas polimórficas y reproducibles en los aislados de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. Los cebadores ISSR 3 [(AG)₈], ISSR 13 [(GACA)₄] e ISSR 15 [(CAC)₅] no generaron bandas o las mismas fueron muy débiles. Los cebadores ISSR 1 [(GAG)₅CAG], ISSR 2 [GTC(GAC)₅], ISSR 4 [(AG)₈G], ISSR 5 [GAT(AGG)₈], ISSR 6 [CTC(GT)₈], ISSR 7 [AG(CTC)₅], ISSR 8 [CT(GA)₈], ISSR 9 [(GA)₈T], ISSR 10 [(GA)₈C], ISSR 11 [GAC(CGCA)₄], ISSR 12 [(GTG)₅] e ISSR 14 [(GCC)₅] presentaron patrones de bandas polimórficos con poco fondo. Entre los cebadores seleccionados, 5 correspondieron a dinucleótidos, 6 a trinucleótidos y 1 a tetranucleótidos con, o sin, el extremo 5' degenerado. Estos últimos 12 cebadores, se seleccionaron para analizar la variabilidad genética en aislados de *Aspergillus* sección *Nigri*.

La reproducibilidad de las bandas amplificadas con estos 12 cebadores, se confirmó al menos dos veces obteniéndose idénticos resultados en todas las experiencias. A pesar de su característica de semiarbitrariedad, la técnica ISSR posee una mayor reproducibilidad que el marcador RAPD. La reproducibilidad de los ISSR no está fuertemente influenciada por los cambios del número de ciclos de amplificación de PCR o por las amplificaciones llevadas a cabo en diferentes termocicladores, como sí ocurriría con la técnica RAPD. A modo de ejemplo en la Figura V.17 se muestra el perfil de bandas de las 9 cepas evaluadas utilizando el cebador ISSR 9.



Figura V.17 Perfiles ISSR de las 9 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* analizadas usando el ISSR9. Líneas 1-2: *A. japonicus* ITEM 7034; Líneas 3-4: *A. aculeatus* ITEM 7046; Líneas 5-6: *A. uvarum* ITEM 4834; Líneas 7-8: *A. carbonarius* A2034; Líneas 9-10: *A. ibericus* ANRC 500; M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); Líneas 11-12: *A. niger* FRR 5695; Líneas 13-14: *A. tubingensis* ITEM 4845; Líneas 15-16: *A. welwitschiae* ANRC 524; Líneas 17-18: *A. luchuensis* ANRC 703; Línea 19: control negativo sin ADN.

Usando los 12 cebadores, se observó un alto nivel de polimorfismo dentro de los grandes grupos morfológicos: Serie Carbonaria (*A. carbonarius*; *A. ibericus*), *Aspergillus* Uniseriados (*A. japonicus*; *A. aculeatus*; *A. uvarum*) y el agregado *A. niger* (*A. niger*; *A. welwitschiae*; *A. tubingensis*; *A. luchuensis*). En los *Aspergillus* uniseriados, los 12 cebadores seleccionados amplificaron 205 bandas reproducibles entre 200 y 2200 pb aproximadamente; 182 de ellas (89%) fueron polimórficas. En el grupo agregado *A. niger* los 12 cebadores amplificaron un total de 195 bandas reproducibles entre 210 y 2500 pb; 180 de ellas (92,3%) fueron polimórficas, mientras que, en la serie Carbonaria se obtuvieron un total de 171 bandas reproducibles entre 230 y 2200 pb y 133 (77,8%) fueron polimórficas (Tabla V.5).

La mayoría de las bandas polimórficas amplificadas se obtuvieron usando los cebadores ISSR 2, ISSR 8 y ISSR 14 para el agregado *A. niger* (100% polimórficos), ISSR 8 y ISSR 11 para *Aspergillus* Uniseriados (100% polimórficos), ISSR 7 para la Serie Carbonaria (100% polimórficos). En cambio, la menor cantidad de bandas polimórficas se obtuvieron con los cebadores ISSR 4, ISSR 10 y ISSR 4 para el

agregado *A. niger*, *Aspergillus* Uniseriados y Serie Carbonaria, respectivamente (77,8%, 76,5% y 54%, respectivamente). El cebador ISSR 8 fue el que amplificó el mayor número de loci polimórficos (Tabla V.5).

Tabla V.5. Características principales de los cebadores de ISSR seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de *Aspergillus* sección *Nigri*.

Primer ISSR	<i>Aspergillus uniseriados</i>			Agregado <i>A. niger</i>			Serie Carbonaria		
	BA ^a	BP ^b	P% ^c	BA ^a	BP ^b	P% ^c	BA ^a	BP ^b	P% ^c
1 (GAG) ₅ CAG	18	16	89	15	14	93	13	8	61
2 GTC(GAC) ₅	21	17	81	17	17	100	19	14	74
4 (AG) ₈ G	14	11	79	9	7	78	13	7	54
5 GAT(AGG) ₈	19	18	94	23	20	87	17	16	94
6 CTC(GT) ₈	13	11	85	14	13	93	9	8	89
7 AG(CTC) ₅	19	17	89	12	11	92	12	12	100
8 CT(GA) ₈	19	19	100	24	24	100	15	13	87
9 (GA) ₈ T	16	14	88	21	20	95	17	12	71
10 (GA) ₈ C	17	13	76	18	16	89	16	14	87
11 GAC(CGCA) ₄	17	17	100	20	17	85	16	12	75
12 (GACA) ₄	12	10	83	9	8	89	9	7	78
14 (GCC) ₅	10	9	90	13	13	100	15	11	73
Combinados	205	172	89	195	180	92	171	134	78

^a Bandas amplificadas; ^b bandas polimórficas; ^c Porcentaje de bandas polimórficas

En todos los perfiles ISSR se encontraron bandas polimórficas únicas en las distintas especies evaluadas, las cuales podrían representar sitios blanco para el posible desarrollo de cebadores específicos de especie (Figura V.17).

En general, los 12 cebadores ISSR seleccionados fueron capaces de separar los tres grandes grupos de la sección *Nigri*: *Aspergillus* Uniseriados, *Aspergillus* de la Serie Carbonaria y *Aspergillus* del agregado *A. niger*, que se agruparon en dos clusters principales (I y II) (Figura V.18).

El **cluster I** incluyó a los *Aspergillus* Uniseriados (*A. japonicus*, *A. aculeatus* y *A. uvarum*) y a los *Aspergillus* de la Serie Carbonaria (*A. carbonarius* y *A. ibericus*) que fueron resueltos en dos subclados (Ia y Ib) con altos valores de soporte: *Aspergillus* uniseriados (98% de soporte) y *Aspergillus* de la Serie Carbonaria (71% de soporte) (Figura V.18).

El **cluster II** incluyó a las especies pertenecientes al agregado *A. niger* (92% de soporte) que fue resuelto en 3 subclados (IIa, IIb y IIc). El subclado IIa incluyó a las especies *A. welwitschiae* y *A. niger* (100% de soporte), mientras que los subclados IIb y IIc incluyeron a las especies *A. tubingensis* (60% de soporte) y *A. luchuensis* (92% de soporte), respectivamente (Figura V.18).

Los subclados Ia y Ib presentaron un 27% de similitud entre ellos y un 24 % de similitud con el cluster II. En particular, las especies del agregado *A. niger* (cluster II) presentaron un 38% de similitud entre ellas, mientras que las especies de *Aspergillus* uniseriados (cluster Ia) presentaron un 44% y las de la Serie Carbonaria (cluster Ib) sólo un 37% de similitud entre ellas (Tabla V.6).

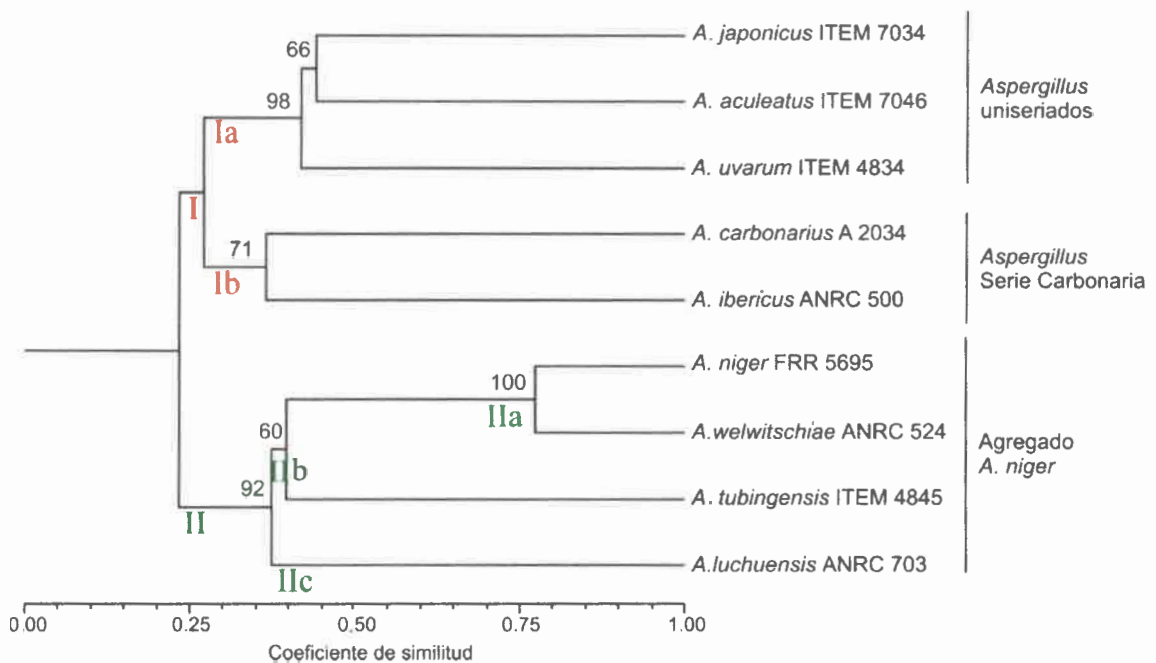


Figura V.18. Dendrograma de 9 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

Tabla V.6. Similitud genética entre las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* obtenidas usando los 12 cebadores de ISSR seleccionados.

Primer ISSR		<i>Aspergillus uniseriados</i>			Agregado <i>A. niger</i>			Serie Carbonaria		
		Similitud genética			Similitud genética			Similitud genética		
		Mínima	Promedio	Máxima	Mínima	Promedio	Máxima	Mínima	Promedio	Máxima
1	(GAG) ₅ CAG	0,40	0,45	0,53	0,24	0,47	0,95	0,55	0,55	0,55
2	GTC(GAC) ₅	0,45	0,50	0,54	0,27	0,41	0,67	0,43	0,43	0,43
4	(AG) ₈ G	0,38	0,53	0,78	0,40	0,68	0,92	0,67	0,67	0,67
5	GAT(AGG) ₈	0,32	0,38	0,44	0,35	0,54	0,83	0,12	0,12	0,12
6	CTC(GT) ₈	0,27	0,40	0,50	0,20	0,35	0,88	0,20	0,20	0,20
7	AG(CTC) ₅	0,30	0,37	0,44	0,20	0,40	1	0	0	0
8	CT(GA) ₈	0,14	0,25	0,38	0,09	0,29	0,59	0,33	0,33	0,33
9	(GA) ₈ T	0,38	0,50	0,61	0,36	0,47	0,67	0,45	0,45	0,45
10	(GA) ₈ C	0,44	0,54	0,63	0,31	0,47	0,71	0,22	0,22	0,22
11	GAC(CGCA) ₄	0	0,22	0,67	0,35	0,50	0,63	0,40	0,40	0,40
12	(GACA) ₄	0,31	0,52	0,71	0,22	0,48	0,83	0,36	0,36	0,36
14	(GCC) ₅	0,18	0,36	0,67	0	0,15	0,73	0,42	0,42	0,42
	Combinado	0,40	0,43	0,44	0,36	0,45	0,77	0,37	0,37	0,37

A través de los resultados obtenidos, se encontró un marcador molecular ISSR que permitió agrupar las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*. A su vez, se pretendía evaluar la diversidad genética de las especies presentes en los diferentes sustratos por lo que, una vez optimizada la metodología se aumentó el número de cepas pertenecientes a una misma especie. Para esto, en un primer momento se analizaron un total de 23 cepas aisladas de los diferentes sustratos, las cuales habían sido anteriormente identificadas usando cebadores específicos y/o secuenciación parcial del gen de la calmodulina.

De los doce cebadores analizados durante la optimización de la metodología, se seleccionaron un total de 7 (ISSR 1, ISSR 2, ISSR 5, ISSR 6, ISSR 7, ISSR 9 e ISSR 11) para analizar las 23 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes sustratos. La selección fue realizada teniendo en cuenta principalmente la facilidad de lectura de las bandas (mayores diferencias en pares de bases entre las bandas amplificadas).

Al aumentar el número de cepas evaluadas, se observó un mayor nivel de polimorfismo dentro de los grandes grupos morfológicos: Serie Carbonaria (*A. carbonarius*; *A. ibericus*), *Asperillus* Uniseriados (*A. japonicus*; *A. aculeatus*; *A. uvarum*) y el agregado *A. niger* (*A. niger*; *A. welwitschiae*; *A. tubingensis*; *A. luchuensis*) sin superposición alguna entre ellos.

Cuando se combinaron todos los datos, se obtuvieron un total de 230 bandas reproducibles. En el grupo *Aspergillus* uniseriados, los 7 cebadores seleccionados amplificaron 134 bandas reproducibles entre 280 y 2200 pb aproximadamente, de las cuales 121 (90%) fueron polimórficas (Tabla V.7). Dentro de este grupo, se encontraron bandas específicas de especie que eventualmente podrían representar sitios blancos para el posible desarrollo de cebadores específicos de las tres especies uniseriadas evaluadas.

En el grupo agregado *A. niger*, los 7 cebadores seleccionados amplificaron un total de 153 bandas reproducibles entre 300 y 2500 pb, de las cuales, 148 (97%) fueron polimórficas (Tabla V.7). Dentro de este grupo se encontró la mayor variabilidad entre las especies evaluadas y hubo una clara separación entre las especies *A. niger* / *A. welwitschiae*, *A. luchuensis* y *A. tubingensis*, encontrándose bandas específicas que podrían representar sitios blancos para el posible desarrollo de cebadores específicos.

En las especies pertenecientes a la serie Carbonaria, los 7 cebadores seleccionados amplificaron un total de 117 bandas reproducibles entre 300 y 2200 pb y 102 (87%) fueron polimórficas (Tabla V.7). Dentro de este grupo, también se

encontraron bandas específicas para *A. carbonarius* y *A. ibericus* que podrían representar sitios blancos para el posible desarrollo de cebadores específicos.

Tabla V.7. Cebadores de ISSR seleccionados para analizar la diversidad genética en aislados de *Aspergillus* sección *Nigri* y sus características principales.

Primer ISSR	<i>Aspergillus uniseriados</i>			Agregado <i>A. niger</i>			Serie Carbonaria		
	BA ^a	BP ^b	P% ^c	BA ^a	BP ^b	P% ^c	BA ^a	BP ^b	P% ^c
1 (GAG) ₅ CAG	18	16	89	17	16	94	13	9	69
2 GTC(GAC) ₅	22	18	82	24	24	100	19	15	79
5 GAT(AGG) ₈	21	20	95	24	23	96	17	16	94
6 CTC(GT) ₈	17	15	88	20	20	100	13	11	84
7 AG(CTC) ₅	19	17	89	24	23	96	16	16	100
9 (GA) ₈ T	18	16	89	22	21	95	23	21	91
11 GAC(CGCA) ₄	19	19	100	22	21	95	16	14	87
Combinados	134	121	90	153	148	97	117	102	87

^a Bandas amplificadas; ^b bandas polimórficas; ^c Porcentaje de bandas polimórficas; nd: no determinado.

Al igual que lo sucedido durante la optimización de la metodología, los 7 cebadores ISSR seleccionados fueron capaces de separar los tres grandes grupos de *Aspergillus* sección *Nigri* (*Aspergillus* Uniseriados, *Aspergillus* de la Serie Carbonaria y *Aspergillus* del agregado *A. niger*), los cuales se agruparon en dos clusters principales (I y II) (Figura V.19).

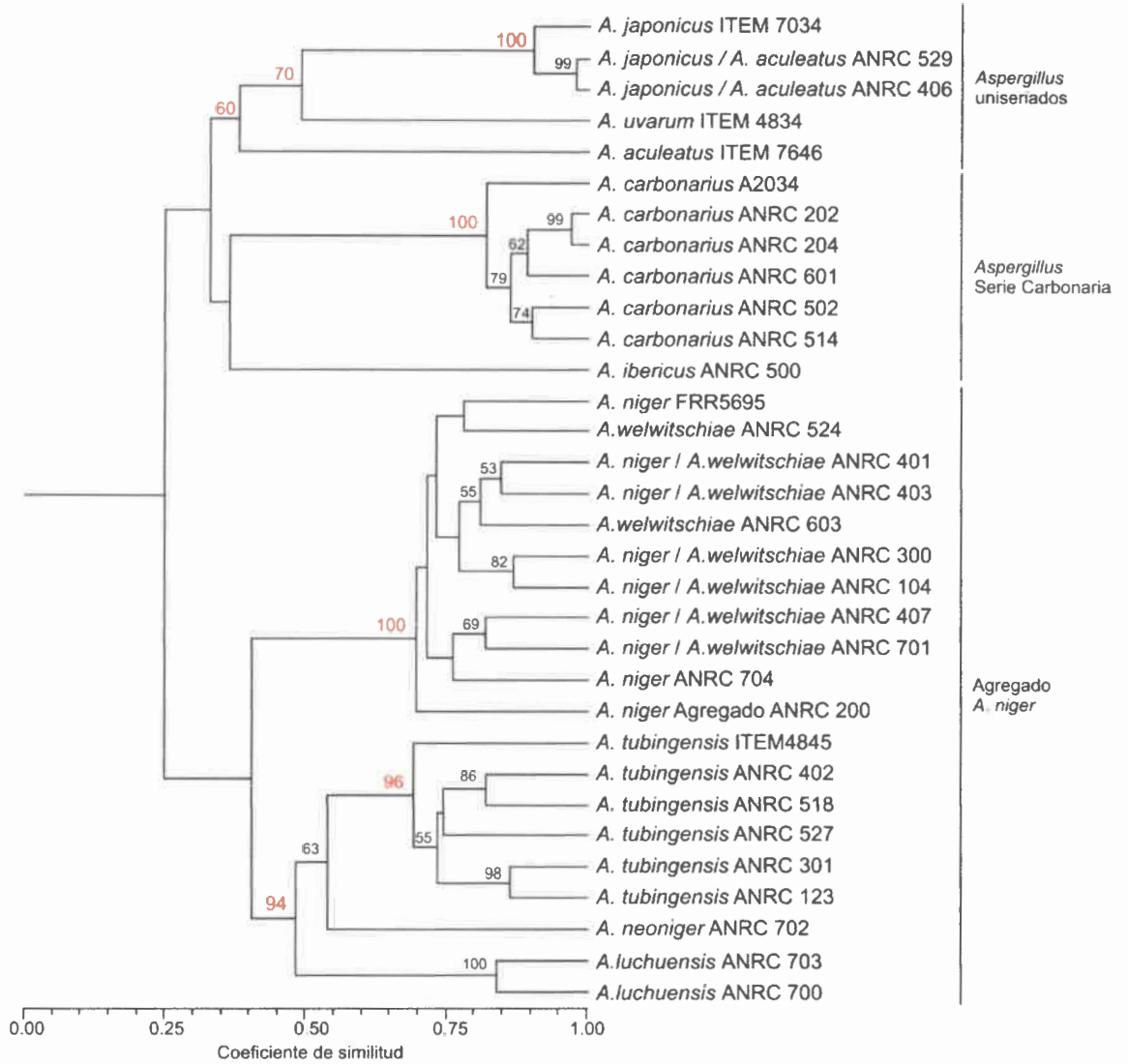


Figura V.19. Dendrograma de 32 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

El **cluster I** incluyó a los *Aspergillus* Uniseriados (*A. japonicus*, *A. aculeatus* y *A. uvarum*) y a los *Aspergillus* de la Serie Carbonaria (*A. carbonarius* y *A. ibericus*) que fueron resueltos en dos subclados (Ia y Ib). El subclado Ia contiene a las especies *A. japonicus* (100% de soporte), *A. uvarum* (70% de soporte) y *A. aculeatus* (60% de soporte), mientras que el subclado Ib contiene a las especies biseriadas *A. carbonarius* (100% de soporte) y *A. ibericus* (55% de soporte) (Figura V.19).

El **cluster II** incluyó a las especies pertenecientes al agregado *A. niger* que fue resuelto en 3 subclados (IIa, IIb y IIc). El subclado IIa incluyó a las especies *A. welwitschiae* y *A. niger* (100% de soporte), mientras que los subclados IIb y IIc incluyeron a las especies *A. tubingensis* (96% de soporte) y *A. luchuensis* (94% de soporte), respectivamente (Figura V.19). Cabe aclarar que dentro de este cluster se ubicó también la cepa ANRC 702 identificada a través de secuenciación parcial del gen de la calmodulina como *A. neoniger*.

Las cepas pertenecientes a los subclados Ia y Ib presentaron un 32,8% de similitud entre ellas y un 24 % de similitud con las del cluster II. En particular, las especies del agregado *A. niger* (cluster II) presentaron un 40% de similitud entre ellas, mientras que las especies de *Aspergillus* uniseriados (cluster Ia) presentaron un 38% y las de la Serie Carbonaria (cluster Ib) sólo un 36% de similitud entre ellas. Por primera vez se realizó un estudio sobre la diversidad genética de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* usando el marcador molecular ISSRs. Mediante dicha técnica se detectó una alta variabilidad genética entre cepas aisladas de diferentes sustratos y orígenes geográficos.

Para verificar el análisis de cluster realizado se procedió a calcular una matriz cofenética (realizada a partir del dendrograma; Coph, NTSYS) y compararla con la matriz de similitud genética (MxComp, NTSYS). El coeficiente de correlación resultante fue de 0,97, lo cual indica que no habría distorsión entre el dendrograma y la matriz de similitud genética (Anexo VIII.3).

El resultado del análisis de coordenadas principales se muestra en la Figura V.20. La coordenada principal 1 (Dim-1) representó el 21,66% y separó los dos grupos principales, I (*Aspergillus* Uniseriados y Serie Carbonaria) y II (agregado *A. niger*). Las coordenadas principales 2 y 3 representan el 13,24% y 11,65%, respectivamente, proporcionando las demás diferenciaciones. El análisis de coordenadas principales fue consistente con los resultados del análisis de cluster.

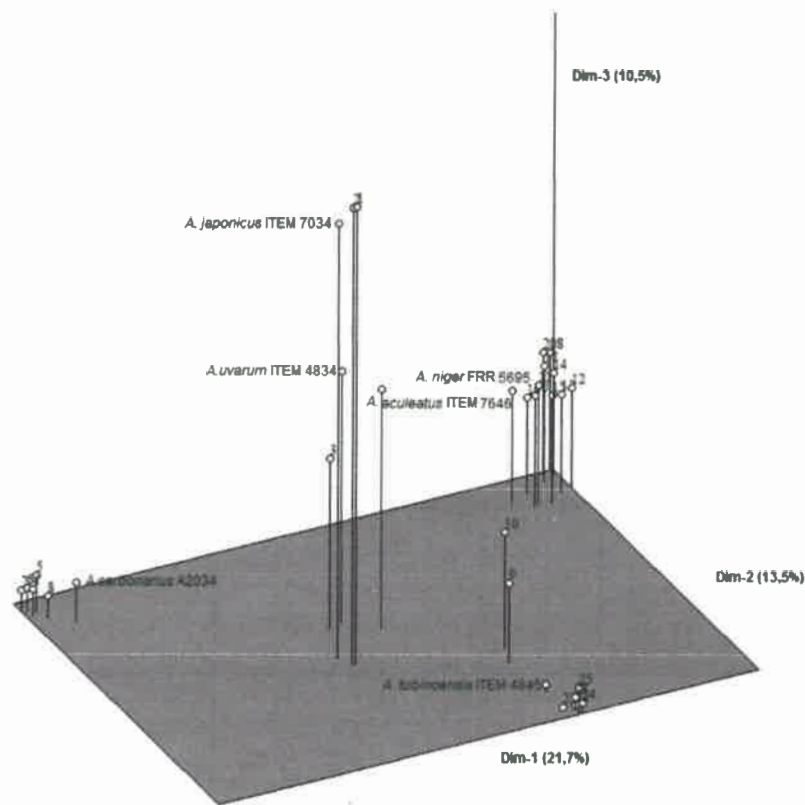


Figura V.20. Análisis de coordenadas principales del conjunto de datos ISSR derivados de las 31 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* analizadas. Se muestra las tres primeras coordenadas principales y la proporción de varianza que lo explican (Dim 1, Dim 2 and Dim 3) (3-D plot).

La técnica ISSR fue originalmente desarrollada por Zietkiewicz y col. (1994) para analizar la diversidad genética en plantas y animales. Más tarde, esta técnica también demostró ser una herramienta poderosa para el análisis de la variabilidad genética en hongos (Hantula y col., 1996). Existen muchos ejemplos de hongos que han sido caracterizados mediante la técnica ISSR como *Phytophthora cactorum* (Hantula y col., 1997), *Claviceps* spp. (Tooley y col., 2000), *Botryosphaeria* spp. (Zhou y col., 2001), *Phaeoisariopsis griseola* (Mahuku y col., 2002), *P. citrophthora* (Cohen y col., 2003), *Rhizoctonia solani* (Elbakali y col., 2003), entre otros.

También ha sido utilizada para analizar el grado de intercambio genético y el modo de reproducción en poblaciones de *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. crookwellense* (Naef & Défago 2006; Mishra y col., 2004) y *F. pseudograminearum* (Mishra y col., 2006). Esta técnica también fue utilizada para caracterizar la variabilidad genética intra e interespecífica entre aislamientos de diferentes *Fusarium* spp. pertenecientes a tres secciones diferentes (Saharan & Naef 2008).

Dentro de las especies del género *Aspergillus*, los datos obtenidos mediante ISSR son muy escasos. Batista y col. (2008) usaron diferentes marcadores moleculares, entre ellos ISSR, para caracterizar genéticamente cepas de *Aspergillus flavus* y otras especies pertenecientes al grupo *A. flavus*. De acuerdo a los resultados obtenidos mediante ISSR y RAPD debieron reclasificar algunas cepas que previamente habían sido identificadas como *A. flavus* (una cepa fue reclasificada como *A. oryzae*, una como *A. parasiticus* y dos como *A. tamarii*). Por otro lado, una cepa previamente identificada como *A. parasiticus* fue reclasificada como *A. flavus*.

Recientemente, Neal y col. (2011) analizaron una amplia colección de cepas de *A. terreus* aislados de casos de aspergilosis invasiva (AI) usando ISSR a fin de determinar la variabilidad genética de las mismas. Los autores pudieron identificar a través de este marcador la presencia de *A. alabamensis*, una especie recientemente descrita y que no había sido aislada con anterioridad en Estados Unidos.

En el presente estudio, los 7 cebadores ISSR seleccionados detectaron altos porcentajes de polimorfismo entre las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* evaluadas. A su vez, el dendrograma obtenido con el análisis de agrupamiento de las bandas generadas con estos 7 cebadores, fue robusto y estuvo de acuerdo con la identidad de los aislados evaluados. El análisis de clusters mostró 3 principales grupos dentro de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*: *Aspergillus* uniseriados, *A. carbonarius* y agregado *A. niger*. Con respecto a la variabilidad intraespecie, las cepas de *A. carbonarius* constituyeron un grupo homogéneo mientras que entre las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* el grado de diversidad genética fue mucho mayor. Las cepas de *A. tubingensis*, *A. niger* /*A. welwitschiae* y *A. luchuensis* fueron claramente separadas por ISSR en tres clusters diferentes. Estos resultados son consistentes con otros varios estudios donde se usaron otros marcadores moleculares (Varga y col., 1993, 1994; Accensi y col., 1999; Parenicová y col., 1997; Perrone y col., 2006 a, b). El nivel de sensibilidad de la técnica fue similar a otras técnicas moleculares usadas previamente para caracterizar a las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, tales como RFLP (Kusters van Someren y col., 1991), AFLP (Perrone y col., 2006 a, b; Chiotta y col., 2010), PCR-SSCP (Susca y col., 2007) y ap-PCR (Martinez-Culebras y col., 2009).

Uno de los marcadores neutros más utilizados para determinar la variabilidad intraespecie de *Aspergillus* sección *Nigri* es la técnica AFLP. Recientemente, Chiotta y col. (2010) evaluaron 88 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de uvas de Argentina usando de dichos marcadores. Similiar a lo que ocurrió en el presente

estudio usando marcadores ISSR, el análisis de los perfiles generados mediante AFLP mostró una clara separación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* en 4 grupos: *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, agregado *A. niger* y *Aspergillus* uniseriados. Las cepas de *A. carbonarius* formaron un grupo bastante homogéneo, mientras que las especies del agregado *A. niger* y las especies uniseriadas mostraron la mayor variabilidad genética. El cluster *A. tubingensis* fue el grupo prevalente y se separó claramente del agregado *A. niger*. Además, no se encontraron diferencias genotípicas entre las cepas productoras y no productoras de OTA. Resultados similares han sido encontrados por Perrone y col. (2006a, 2006b) al evaluar la diversidad genética de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de diferentes regiones de Europa.

En general, los marcadores moleculares neutros, tales como RFLP, RAPD y AFLP suelen presentar algunos inconvenientes tales como elevada laboriosidad y costo y, dificultad en la automatización, como en el caso de AFLP; problemas de reproducibilidad entre laboratorios y dificultad en la lectura de los datos obtenidos, como en el caso de RAPD, y en algunos casos, como en el RFLP, no tienen suficiente capacidad de discriminación a nivel interespecífico (Gil-Lamagnere y col., 2003; Webster and Weber 2009). No cabe duda que la combinación de información procedente de diferentes tipos de marcadores (incluidos la secuenciación de regiones no codificantes o de genes funcionales) proporciona la mejor aproximación posible al conocimiento sobre la variación genética. Asimismo, la información molecular sería de poca ayuda si no se cuenta con datos morfológicos, fisiológicos y/o ecológicos. En este contexto, se puede lograr una caracterización preliminar con marcadores moleculares más accesibles, simples de utilizar y de bajo costo pero con alta reproducibilidad, como los ISSR.

Además de determinar la variabilidad genética, la técnica ISSR fue usada en el presente estudio en un intento para agrupar las cepas de acuerdo a su perfil toxicogénico, origen geográfico y/o sustrato a partir del cual habían sido aisladas. Aunque el número de cepas es pequeño para llegar a una conclusión definitiva, los perfiles generados por ISSR no fueron efectivos para discriminar entre las cepas con diferente perfil toxicogénico, origen geográfico y/o sustrato. Este resultado concuerda con estudios previos de aspergilos negros aislados de uvas usando otras técnicas moleculares tales como AFLPs (Schmidt y col., 2004; Perrone y col., 2006b). A este respecto, Mishra y col. (2004) observaron una alta diversidad genética en poblaciones de *F. graminearum* pertenecientes a distintas provincias de Canadá y los perfiles generados por ISSR se correlacionaron parcialmente con el origen geográfico de los

aislamientos. Neal y col. (2011) encontraron que las cepas de *A. terreus* aisladas de Europa conformaron un único clado separado de las cepas aisladas de Estados Unidos, lo cual sería evidencia de una estructura de la población vinculada al origen geográfico de *A. terreus*.

V.4.1. Evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas de maní a través del uso de marcadores ISSRs

Se evaluaron 53 cepas (3 *Aspergillus* uniseriados y 50 pertenecientes al agregado *A. niger*) aisladas de maní de la localidad de Los Molles (Córdoba) con los cebadores ISSR6 e ISSR11 y se compararon con cepas identificadas anteriores (*A. ibericus* ANRC 500, *A. carbonarius* ANRC 514, *A. japonicus* ITEM 7034, *A. aculeatus* ITEM 7046, *A. uvarum* ITEM 4834, *A. niger* ANRC 704, *A. tubingensis* ITEM 4845, *A. luchuensis* ANRC 703 y *A. welwitschiae* ANRC 524). El perfil de bandas obtenido con el cebador ISSR6 se muestra en la Figura V.21.

Los dos cebadores ISSR seleccionados (ISSR6 e ISSR11) fueron capaces de separar los tres grandes grupos de la sección *Nigri* (*Aspergillus* Uniseriados, *Aspergillus* de la Serie Carbonaria y *Aspergillus* del agregado *A. niger*) que se agruparon en dos clusters principales (I y II) (Figura V.22).

El **cluster I** incluyó a los *Aspergillus* Uniseriados (*A. japonicus*, *A. aculeatus* y *A. uvarum*) con altos valores de soporte: *A. japonicus* (72%), *A. uvarum* (100%) (Figura V.22). Dentro de este cluster, se ubicaron las 3 cepas identificadas morfológicamente como *Aspergillus* uniseriados y que amplificaron con los cebadores específicos de *A. japonicus/A. aculeatus* (JAPO1/JAPO2). Dichas cepas mostraron 91% de similitud genética con la cepa de referencia *A. uvarum* ITEM 4834, 45% con *A. japonicus* ITEM 7034, y 28% con *A. aculeatus* ITEM 7046.



Figura V. 21. Perfiles ISSR de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de maní usando el cebador ISSR6. Línea 1: *A. japonicus* ITEM 7034; Línea 2: *A. aculeatus* ITEM 7046; Línea 3: *A. uvarum* ITEM 4834; Línea 4: *Aspergillus* uniseriado ANRC 410; Línea 5: *Aspergillus* uniseriado ANRC 426; Línea 6: *Aspergillus* uniseriado ANRC 429; Línea 7: *A. carbonarius* ANRC 514; Línea 8: *A. ibericus* ANRC 500; Línea 9: *A. niger* ANRC 704; M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); Línea 10: agregado *A. niger* ANRC 409; Línea 11: agregado *A. niger* ANRC 413; Línea 12: agregado *A. niger* ANRC 414; Línea 13: agregado *A. niger* ANRC 417; Línea 14: agregado *A. niger* ANRC 418; Línea 15: agregado *A. niger* ANRC 419; Línea 16: agregado *A. niger* ANRC 420; Línea 17: *A. tubingensis* ITEM 4845; Línea 18: *A. welwitschiae* ANRC 524; Línea 19: *A. luchuensis* ANRC 703.

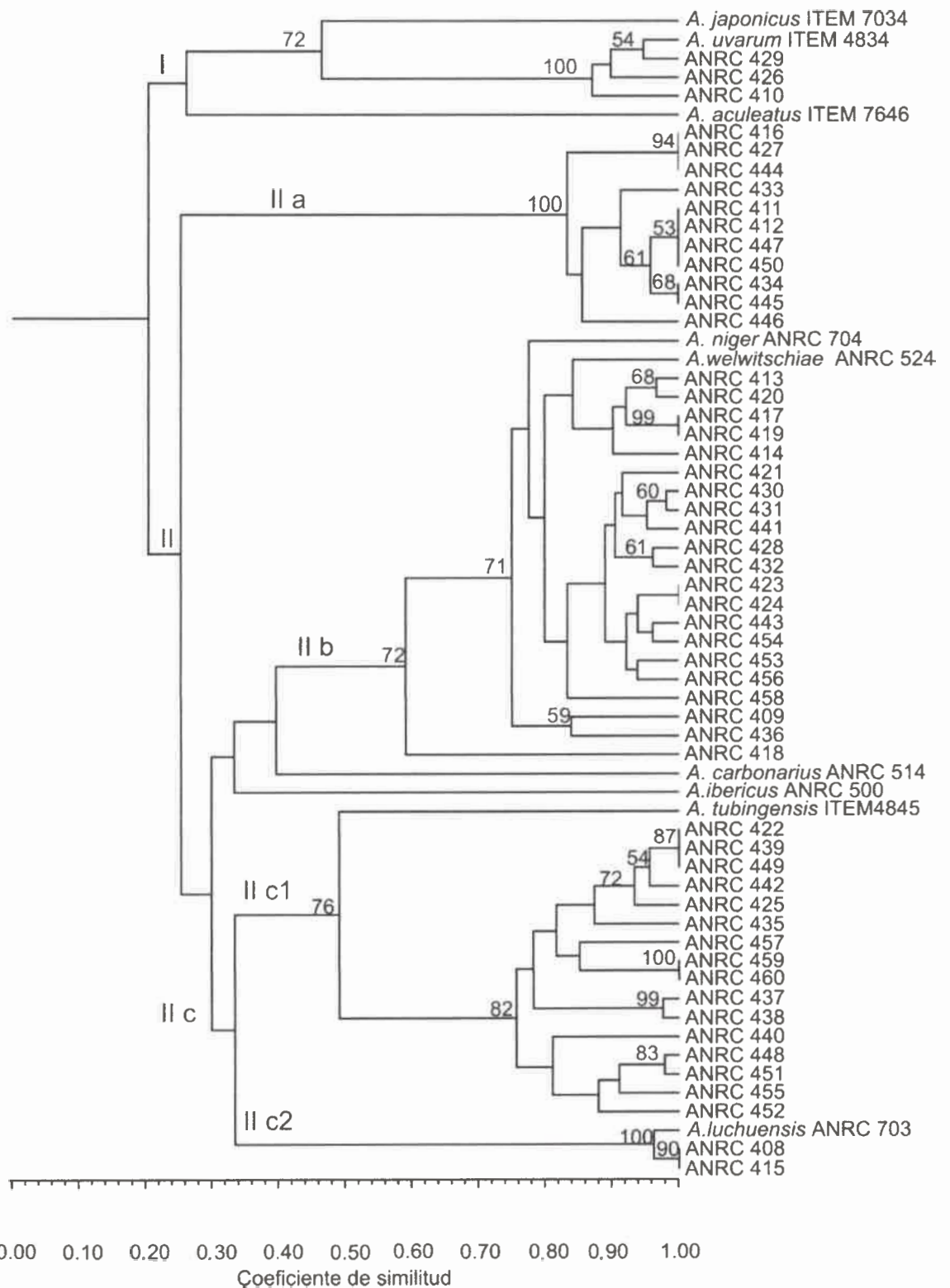


Figura V.22. Dendrograma de 62 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el Índice de similitud genética Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

El **cluster II** incluyó a las especies pertenecientes al agregado *A. niger* y a los *Aspergillus* de la Serie Carbonaria (*A. carbonarius* y *A. ibericus*) y fue resuelto en 3 subclados (IIa, IIb y IIc).

El subclado IIa incluyó 11 cepas pertenecientes al agregado *A. niger* que no habían amplificado los productos específicos usando los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2 (100% de soporte). Estas 11 cepas formaron un grupo homogéneo con poca variabilidad genética entre ellas, una similitud del 84% (80 – 100%) y, con respecto al subclado IIb (*A. niger/A. welwitschiae*) y al subclado IIc (*A. tubingensis*; *A. luchuensis*) fue del 22% y 29%, respectivamente.

El subclado IIb incluyó a las especies *A. welwitschiae* y *A. niger* (72% de soporte) y a las cepas pertenecientes a *Aspergillus* de la Serie Carbonaria (cepas de referencia *A. carbonarius* ANRC 514 y *A. ibericus* ANRC 500). Dentro de este subclado IIb se ubicaron las 21 cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes al agregado *A. niger* y que amplificaron los fragmentos específicos con los cebadores de *A. niger/A. welwitschiae* (NIG1/NIG2). Dichas cepas presentaron una similitud genética de 76% y 77% con las cepas de referencia *A. niger* y *A. welwitschiae*, respectivamente, con altos valores de soporte (72%) (Figura V.22).

El subclado IIc incluyó a las especies *A. tubingensis* (76% de soporte) y *A. luchuensis* (100% de soporte) presentando dos divisiones IIc1 y IIc2, respectivamente (Figura V.22). El subclado IIc1 incluyó 16 cepas que mostraron 50% de similitud genética con la cepa de referencia de *A. tubingensis* ITEM 4845 con altos valores de soporte (76%) y un 75% de similitud genética con una cepa ANRC 452 anteriormente identificada como *A. tubingensis* por análisis preliminar de máxima parsimonia (gen calmodulina) (82% de soporte). Todas estas cepas amplificaron el fragmento específico con los cebadores de *A. tubingensis* (TUB1/TUB2). El subclado IIc2, incluyó 2 cepas que mostraron una similitud genética de 98% con la cepa de referencia *A. luchuensis* ANRC 703 con altos valores de soporte (100%). Estas 2 cepas no habían amplificado los productos específicos usando los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2 (Figura V.22).

Los cluster I (conteniendo a las especies Uniseriadas) y el cluster II (conteniendo a las especies biseriadas), presentaron un 20% de similitud genética entre ellos. En particular, las especies del agregado *A. niger* (cluster II) presentaron un 45% de similitud genética entre ellas, mientras que las especies de *Aspergillus* uniseriados (cluster I) presentaron un 57% y las de la Serie Carbonaria (cluster IIb) sólo un 31% de similitud genética entre ellas.

Para verificar el análisis de cluster realizado se procedió a calcular una matriz cofenética (realizada apartir del dendrograma; Coph, NTSYS), para compararla con la matriz de similitud genética (MxComp, NTSYS). El coeficiente de correlacion resultante fue de 0,86, lo cual indica que no habría distorsion aparente entre el dendrograma y la matriz de similitud genética (Anexo VIII.4).

V.4.2. Evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas de soja a través del uso de marcadores ISSRs

Se evaluaron las 29 cepas de soja (Acopio Río Cuarto) con los cebadores ISSR6 e ISSR7 y se compararon con cepas identificadas anteriormente (*A. japonicus* ITEM 7034, *A. aculeatus* ITEM 7046, *A. uvarum* ITEM 4834, *A. niger* ANRC 703, *A. tubingensis* ANRC 452, *A. luchuensis* ANRC 703, *A. brasiliensis* ANRC 412 y *A. welwitschiae* ANRC 524). El perfil de bandas obtenido con el cebador ISSR6 se muestra en la Figura V.23.

Los dos cebadores ISSR seleccionados (ISSR6 e ISSR7) fueron capaces de separar las 29 cepas evaluadas en dos grandes grupos (*Aspergillus* Uniseriados y *Aspergillus* del agregado *A. niger*) que se agruparon en dos clusters principales (I y II) (Figura V.24).



Figura V.23. Perfiles ISSR de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de soja usando el cebador ISSR6. Línea 1: *A. japonicus* ITEM 7034; Línea 2: *A. aculeatus* ITEM 7046; Línea 3: *A. uvarum* ITEM 4834; Línea 4: agregado *A. niger* ANRC 100; Línea 5: agregado *A. niger* ANRC 108; Línea 6: agregado *A. niger* ANRC 110; Línea 7: agregado *A. niger* ANRC 118; Línea 8: *A. brasiliensis* ANRC 412; Línea 9: *A. luchuensis* ANRC 703; Línea 10: *A. niger* ANRC 704; Línea 11: agregado *A. niger* ANRC 101; M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); Línea 12: agregado *A. niger* ANRC 102; Línea 13: agregado *A. niger* ANRC 103; Línea 14: agregado *A. niger* ANRC 104; Línea 15: agregado *A. niger* ANRC 105; Línea 16: agregado *A. niger* ANRC 106; Línea 17: agregado *A. niger* ANRC 107; Línea 18: agregado *A. niger* ANRC 109; Línea 19: agregado *A. niger* ANRC 111.

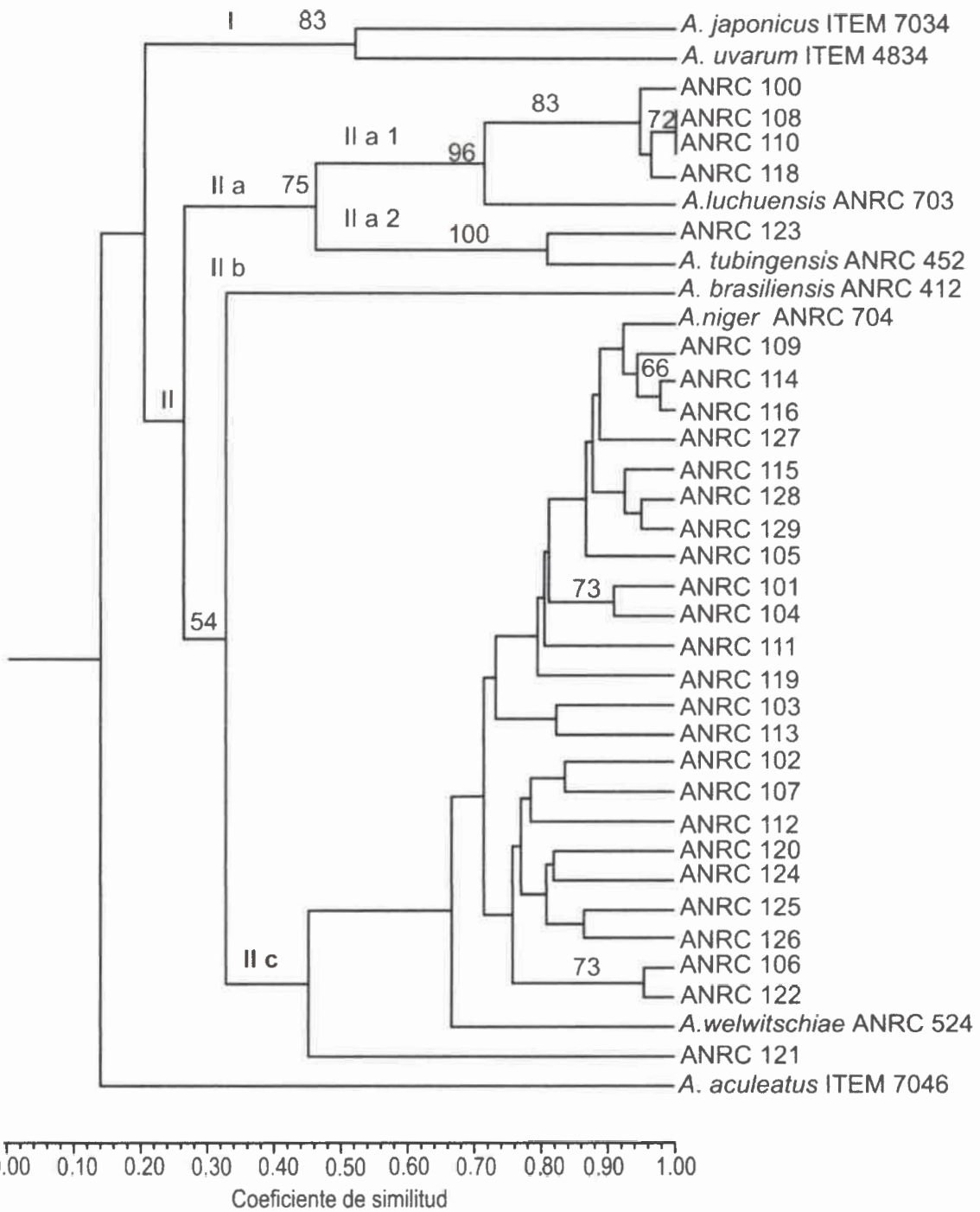


Figura V.24. Dendrograma de 37 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud genética Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

El **cluster I** incluyó a los *Aspergillus* Uniseriados (*A. japonicus* y *A. uvarum*) con altos valores de soporte (84%), mientras que el **cluster II** incluyó a las especies pertenecientes al agregado *A. niger* el cual fue resuelto en 3 subclados (IIa, IIb y IIc) (Figura V.24).

El subclado IIa incluyó a las especies *A. tubingensis* (100% de soporte) y *A. luchuensis* (96% de soporte) y se dividió a su vez en dos subclados, IIa1 y IIa2 (Figura V.24). El subclado IIa1 incluyó 4 cepas que mostraron una similitud genética de 72% con la cepa de referencia *A. luchuensis* ANRC 703 con altos valores de soporte (96%). Estas 4 cepas no habían amplificado los productos específicos usando los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2 y no fueron capaces de producir OTA. El subclado IIa2 incluyó una cepa (ANRC 123) que amplificó con los cebadores específicos de *A. tubingensis* (TUB1/TUB2) y que mostró 81% de similitud genética con la cepa de referencia de *A. tubingensis* ANRC 452, anteriormente identificada por análisis preliminar de máxima parsimonia del gen de la calmodulina (96% de soporte) (Figura V.24).

El subclado IIb incluyó a la especie biseriada *A. brasiliensis* ANRC 412, anteriormente identificada por análisis preliminar de máxima parsimonia del gen de la calmodulina (Figura V.24). La similitud genética promedio con respecto al subclade IIa (*A. tubingensis* y *A. luchuensis*) y al subclade IIc (*A. niger/A. welwitschiae*) fue del 19% y 33%, respectivamente.

El subclado IIc incluyó a las especies *A. welwitschiae* y *A. niger* (54% de soporte). Dentro de este subclado se ubicaron las 24 cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes al agregado *A. niger* y que amplificaron con los cebadores específicos de *A. niger/A. welwitschiae* (NIG1/NIG2). Dichas cepas presentaron una similitud genética de 79% y 66% con las cepas de referencia *A. niger* y *A. welwitschiae*, respectivamente (Figura V.24).

Los cluster I (conteniendo a las especies de *Aspergillus* Uniseriadas) y el cluster II (conteniendo a las especies de *Aspergillus* biseriadas), presentaron un 18% de similitud entre ellos. En particular, las especies del agregado *A. niger* (cluster II) presentaron un 55% de similitud entre ellas, mientras que las especies de *Aspergillus* uniseriados (cluster I) presentaron un 29%.

Para verificar el análisis de cluster realizado se procedió a calcular una matriz cofenética (realizada a partir del dendrograma; Coph, NTSYS), para compararla con la matriz de similitud genética (MxComp, NTSYS). El coeficiente de correlación resultante

fue de 0,96, lo cual indica que no habría distorsión entre el dendrograma y la matriz de similitud genética (Anexo VIII.5).

V.4.3. Evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas de pasas de uvas a través del uso de marcadores ISSRs

Se evaluaron 63 cepas (5 *Aspergillus* uniseriados, 37 pertenecientes al agregado *A. niger* y 23 *Aspergillus* Serie Carbonaria) aisladas de pasas de uvas con los cebadores ISSR6 e ISSR7 y se compararon con cepas identificadas anteriores (*A. ibericus* ITEM 4776, *A. carbonarius* A2034, *A. japonicus* ITEM 7034, *A. aculeatus* ITEM 7046, *A. uvarum* ITEM 4834, *A. niger* ANRC 704, *A.tubingensis* ITEM 4845, *A.luchuensis* ANRC 703 y *A. welwitschiae* ANRC 458). El perfil de bandas obtenido con el cebador ISSR7 se muestra en la Figura V.25.

Los dos cebadores ISSR seleccionados (ISSR6; ISSR7) fueron capaces de separar los tres grandes grupos de la sección *Nigri* (*Aspergillus* Uniseriados, *Aspergillus* de la Serie Carbonaria y *Aspergillus* del agregado *A. niger*) que se agruparon en dos clusters principales (I y II) (Figura V.26).



Figura V.25. Perfiles ISSR de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de pasas de uvas usando el cebador ISSR7. Línea 1: *A. ibericus* ITEM 4776; Línea 2: ANRC 500; Línea 3: ANRC 547; Línea 4: ANRC 501; Línea 5: ANRC 502; Línea 6: ANRC 503; Línea 7: ANRC 504; Línea M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); Línea 8: ANRC 505; Línea 9: ANRC 506; Línea 10: ANRC 507; Línea 11: ANRC 508; Línea 12: ANRC 509; Línea 14: ANRC 510; Línea 14: ANRC 511; Línea 15: ANRC 512; Línea 16: ANRC 513; Línea 17: ANRC 514; Línea 18: ANRC 515.

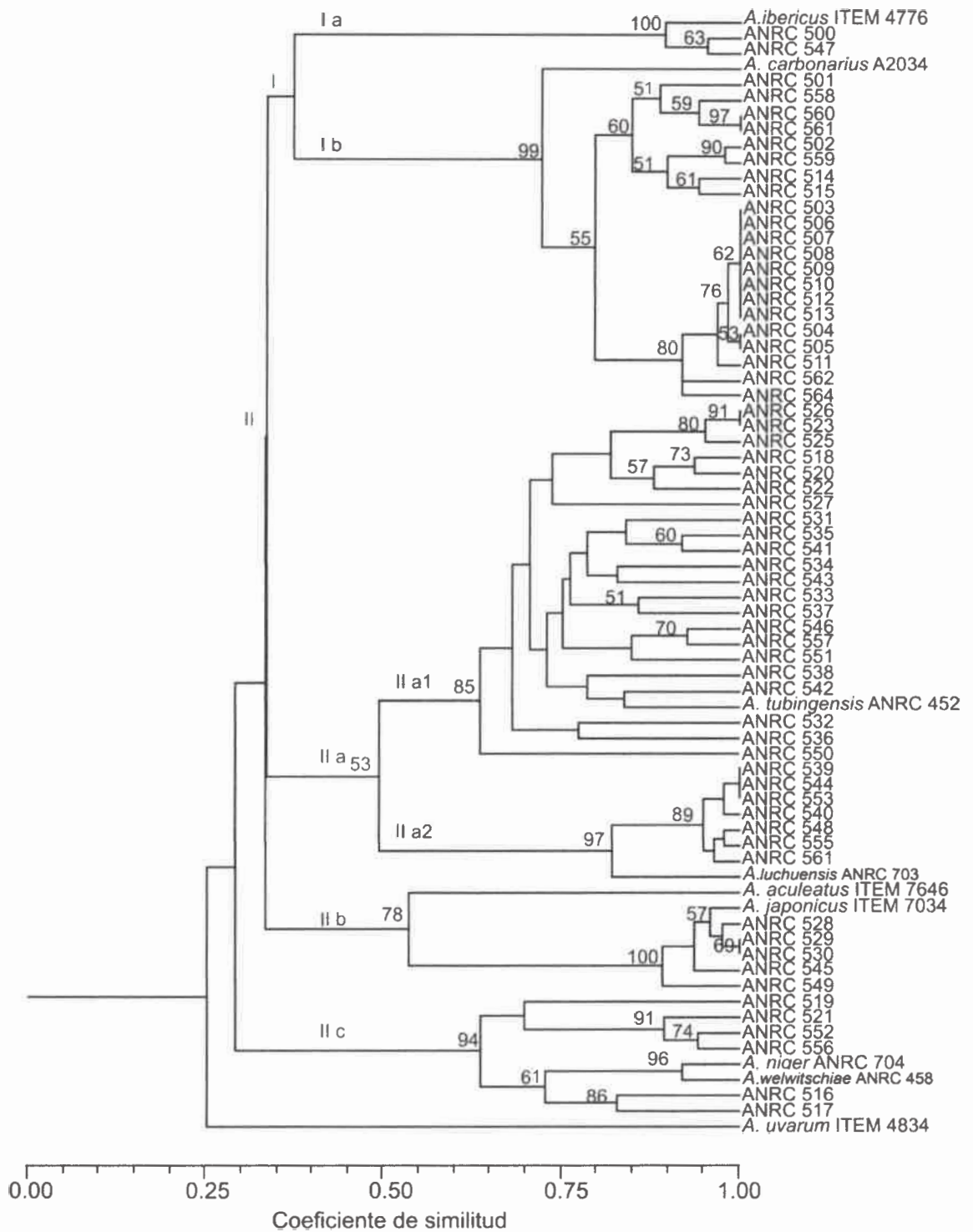


Figura V.26. Dendrograma de 72 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* generados por el software NTSYS utilizando análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud genética Dice. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

El **cluster I** incluyó a las especies pertenecientes a *Aspergillus* de la Serie Carbonaria (*A. carbonarius* y *A. ibericus*) y fue resuelto en 2 subclados (Ia y Ib). El subclado Ia contiene a las cepas ANRC 547 y ANRC 500 identificadas morfológicamente como *A. carbonarius*. Dichas cepas mostraron un 89% de similitud genética con la cepa de referencia *A. ibericus* ITEM 4776 (valor de soporte de 100%) y un 35% de similitud con la cepa de referencia *A. carbonarius* A2034. Cabe aclarar que dichas cepas no amplificaron el fragmento específico usando los cebadores CARBO1/CARBO2 y fueron capaces de producir OTA. El subclado Ib incluyó a las 21 cepas restantes identificadas morfológicamente como *A. carbonarius*, que amplificaron el fragmento específico con los cebadores CARBO1/CARBO2 y solo una de ellas (ANRC 559) no fue capaz de producir niveles detectables de OTA. Éstas presentaron 90% de similitud genética con la cepa de referencia *A. carbonarius* A2034 (valor de soporte 99%).

El **cluster II** incluyó a las especies pertenecientes al agregado *A. niger* (IIa y IIc) y a las especies de *Aspergillus* Uniseriados (*A. japonicus* y *A. aculeatus*) (IIb). El subclado IIa incluyó a las especies *A. tubingensis* (85% de soporte) y *A. luchuensis* (97% de soporte) presentando dos divisiones IIa1 y IIa2, respectivamente (Figura V.26). El subclado IIa1 incluyó 22 cepas que mostraron 72% de similitud genética con la cepa de referencia de *A. tubingensis* ANRC 452 con altos valores de soporte (85%). Todas estas cepas amplificaron el fragmento específico con los cebadores de *A. tubingensis* (TUB1/TUB2). El subclado IIa2, incluyó 7 cepas que mostraron una similitud genética de 82% con la cepa de referencia *A. luchuensis* ANRC 703 con altos valores de soporte (97%). Estas 7 cepas no habían amplificado los productos específicos usando los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2.

El subclado IIb incluyó a las especies *A. japonicus* (100% de soporte) y *A. aculeatus* (78% de soporte). Éste incluyó a 5 cepas identificadas morfológicamente como *Aspergillus* Uniseriados y que amplificaron con los cebadores JAPO1/JAPO2, las cuales mostraron 93% de similitud genética con la cepa de referencia *A. japonicus* ITEM 7034, 30% con *A. uvarum* ITEM 4834 y 54% con *A. aculeatus* ITEM 7046.

El subclado IIc incluyó a las especies *A. welwitschiae* y *A. niger* (94% de soporte). Dentro de este subclado IIc se ubicaron las 6 cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes al agregado *A. niger* y que amplificaron los fragmentos específicos con los cebadores de *A. niger/A. welwitschiae* (NIG1/NIG2). Dichas cepas presentaron una similitud genética de 70% y 67% con las cepas de referencia *A. niger* y *A. welwitschiae*, respectivamente, con altos valores de soporte (94%) (Figura V.26).

Los cluster I (conteniendo a las especies pertenecientes a *Aspergillus* de la Serie Carbonaria) y el cluster II (conteniendo a las especies pertenecientes al agregado *A. niger* y a las especies de *Aspergillus* Uniseriados), presentaron un 31% de similitud genética entre ellos. En particular, las especies del agregado *A. niger* (cluster II) presentaron un 50% de similitud genética entre ellas, mientras que las especies de *Aspergillus* uniseriados (cluster II) presentaron un 60% y las de la Serie Carbonaria (cluster I) sólo un 37% de similitud genética entre ellas.

Para verificar el análisis de cluster realizado se calculó una matriz cofenética (realizada apartir del dendrograma; Coph, NTSYS) y se la comparó con la matriz de similitud genética (MxComp, NTSYS). El coeficiente de correlacion resultante fue de 0,93, lo cual indica que no habría distorsion entre el dendrograma y la matriz de similitud genética (Anexo VIII.6).

V.5. Análisis del gen calmodulina

Basado en los resultados obtenidos mediante cebadores específicos y análisis ISSR se seleccionaron 111 cepas representativas de cada grupo para la secuenciación del gen calmodulina a fin de confirmar el poder de resolución de la técnica ISSR y establecer la identidad a nivel de especie.

El alineamiento de las secuencias de calmodulina (111 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* evaluadas junto con secuencias disponibles en el GenBank) consistió en 629 caracteres, incluyendo 281 sitios informativos de parsimonia; dando lugar a 6 árboles igualmente parsimoniosos (longitud = 878, índice de consistencia = 0.58, índice de retención = 0.93), uno de los cuales se presenta en la Figura V.27. Dichos árboles se encontraron en el 100% de las réplicas, indicando que existe un alto grado de certidumbre para considerar a esta topología como óptima globales para la matriz analizada. La ronda final de TBR no produjo topologías óptimas adicionales.

Hasta el momento, existen 26 taxas dentro de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, incluyendo las nuevas especies *A. saccharolyticus* (Sørensen y col., 2011), *A. floridensis* y *A. trinidadensis* (Jurjević y col., 2012). La sección se pueden dividir en cinco clados principales (llamados Series en Frisvad y col., 2007). Las 111 cepas de *Aspergillus* negros evaluados en el presente estudio se ubicaron dentro de tres de los cinco clados fuertemente soportados (I-V) (Figura V.27).

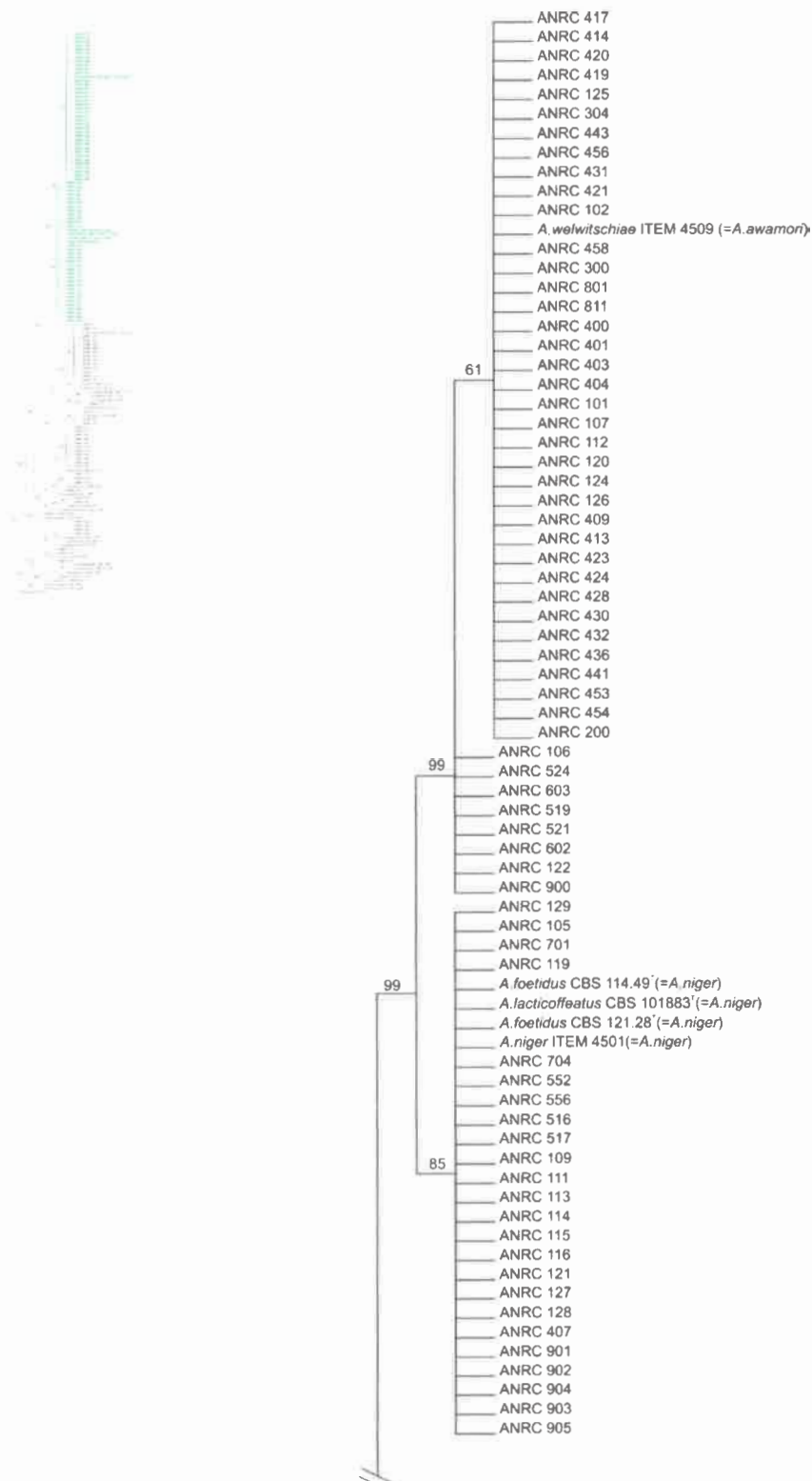


Figura V.27a. Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del calmodulina de las 111 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank. La cepa *A. flavus* (CBS 100927) se usó como grupo externo. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

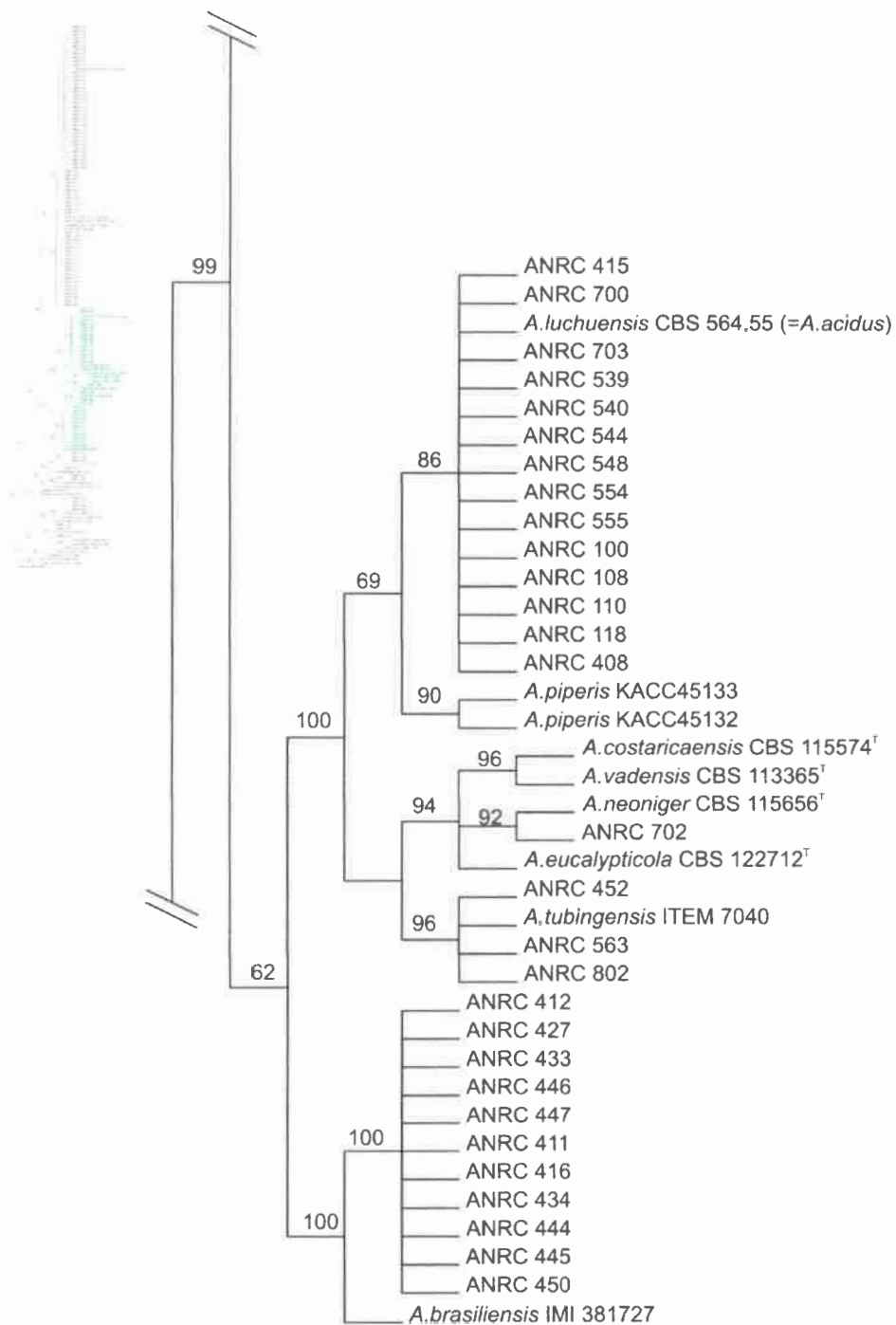


Figura V.27b. Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del calmodulina de las 111 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank. La cepa *A. flavus* (CBS 100927) se usó como grupo externo. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

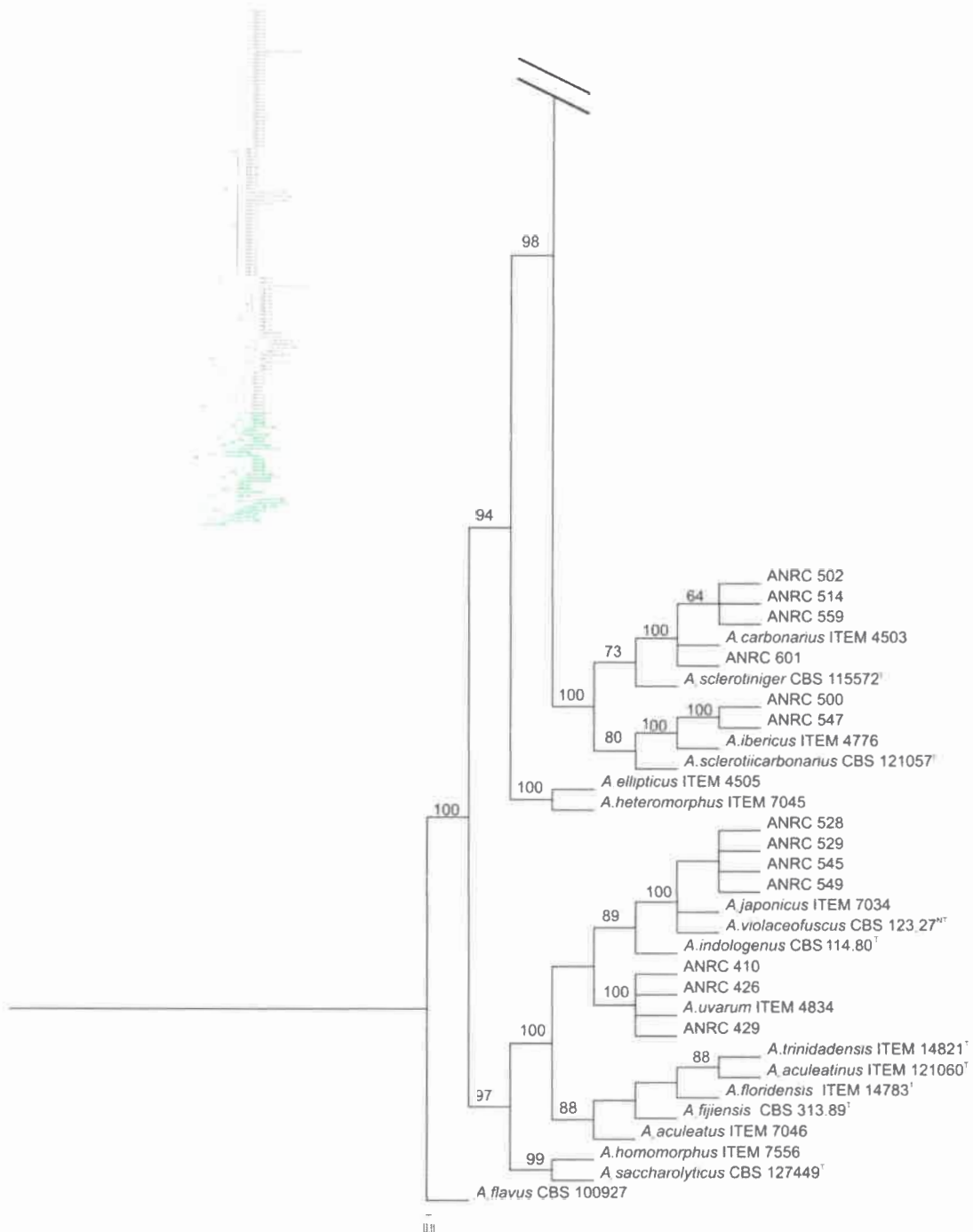


Figura V.27c. Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de las secuencias del calmodulina de las 111 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank. La cepa *A. flavus* (CBS 100927) se usó como grupo externo. Los valores de soporte mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

El clado de *A. niger* (Clado I) incluyó 10 especies biseriadas (100% de soporte), y se subdividió en tres subgrupos: subgrupo *A. niger* (Ia), *A. tubingensis* (Ib) y *A. brasiliensis* (Ic).

El subgrupo Ia (99% de soporte) incluyó las cepas que habían amplificado con los cebadores específicos de *A. niger* (Tabla V.3). Adicionalmente, el subgrupo Ia incluyó las cepas de referencias *A. niger* ITEM 4501, *A. foetidus* CBS 121.28, *A. foetidus* NRRL 341 (=CBS 114.49) y *A. lacticoffeatus* CBS 101883T. Dentro de este subgrupo, 45 cepas formaron un grupo independiente junto con la cepa de referencia *A. welwitschiae* CBS 557.65T (= *A. awamori* ITEM 4509) (99% de soporte) (Figura V.27a). Recientemente, se ha descrito que *A. niger* contiene la especie filogenéticamente críptica *A. awamori* (Perrone y col., 2011). Dichas especies no pueden distinguirse usando caracteres morfológicos o producción de extrólitos. Sin embargo, datos moleculares incluyendo secuenciación de los genes de β -tubulina, calmodulina o factor de elongación, AFLP, UP-PCR pueden distinguir estas dos especies (Perrone y col., 2011; Varga y col., 2011). *Aspergillus awamori* cumple los requisitos para el reconocimiento de especies bajo el criterio de *phylogenetic and genealogical concordance phylogenetic species recognition* (GCPSR) (Dettman et al., 2003). En el criterio GCPSR un clado es reconocido como una especie cuando el grupo monofilético está concordantemente apoyado en la mayoría de los loci, o bien apoyado por al menos un locus, pero no en contradicción con cualquier otro locus. En el análisis multilocus llevado a cabo por Perrone y col. (2011), el locus de calmodulina, tratado bajo el criterio de parsimonia, es el único en el cual ambas especies se encuentran como grupos monofiléticos distintos con altos valores de soporte, no observándose contradicción en los demás loci analizados. En el presente trabajo también se puso a prueba la monofilia de este grupo de especies mediante la generación del árbol consenso (Figura V.28). En lo que respecta a los marcadores *fingerprinting* AFLP en la distinción de estas especies crípticas existen datos ambiguos, tal vez debido a las diferentes combinaciones de cebadores utilizados.

En la Figura V.29 se muestra un mapa de sinapomorfias comunes (caracteres derivados compartidos) de los 6 árboles igualmente parsimoniosos (878 pasos).

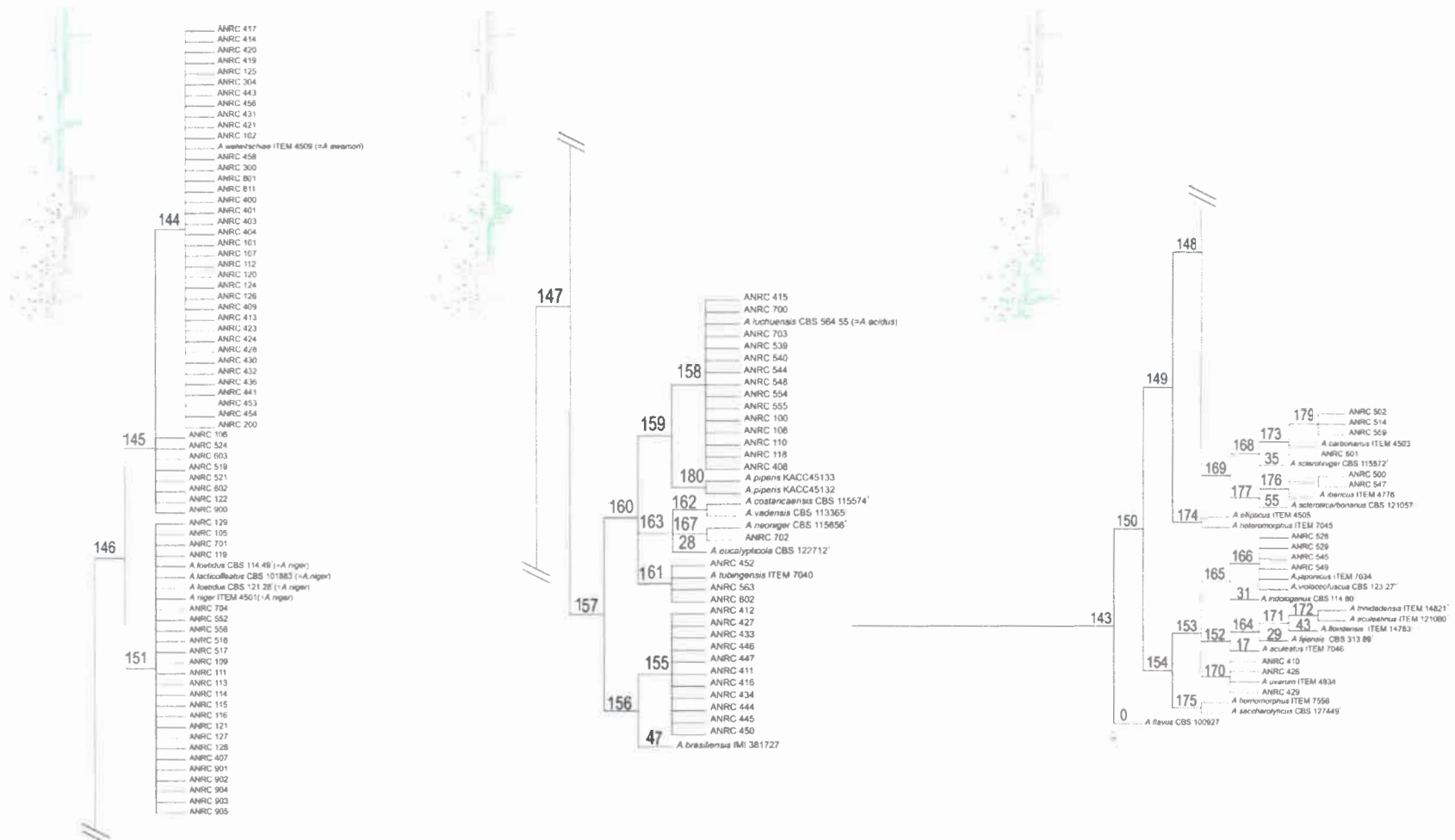


Figura V.28. Árbol consenso de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados a partir de los datos combinados de las secuencias de calmodulina de las 111 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* del presente estudio y de las 31 cepas de las secuencias disponibles en el GenBank. La cepa *A. flavus* (CBS 100927) se usó como grupo externo. En la parte superior de las ramas se muestra el número de nodo.

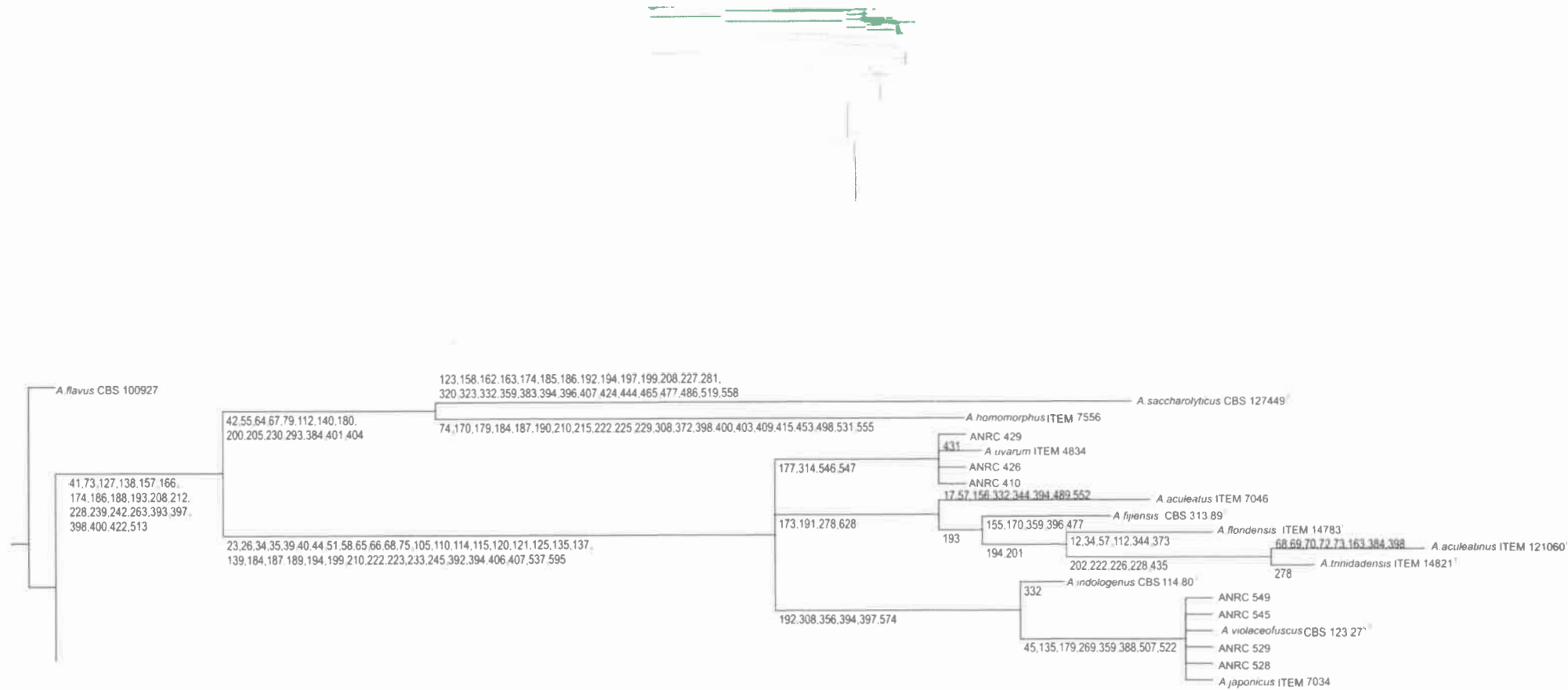


Figura V.29. Mapa de sinapomorfias comunes de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados. En la parte superior de las ramas se muestra los caracteres sinapomorficos.

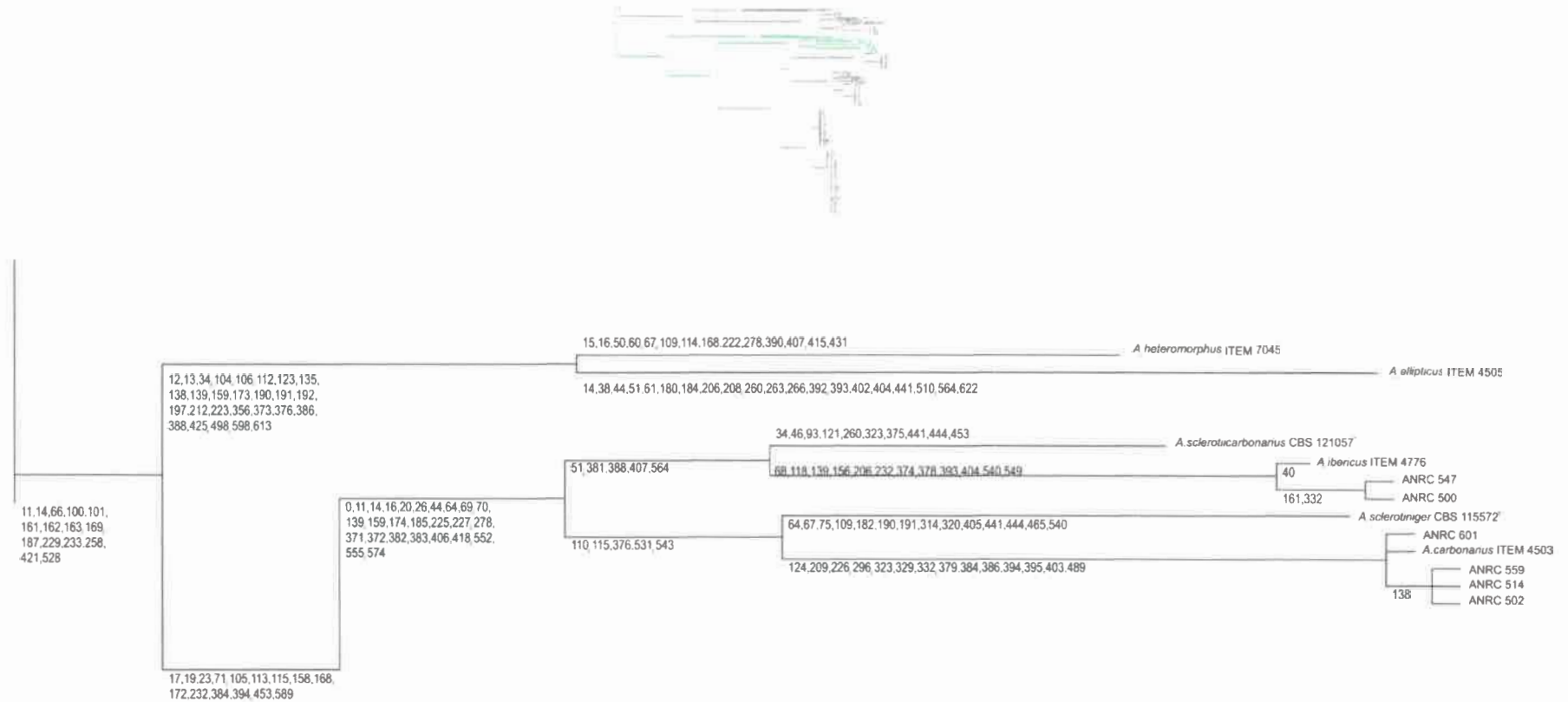


Figura V.29. Mapa de sinapomorfias comunes de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados. En la parte superior de las ramas se muestra los caracteres sinapomórficos.

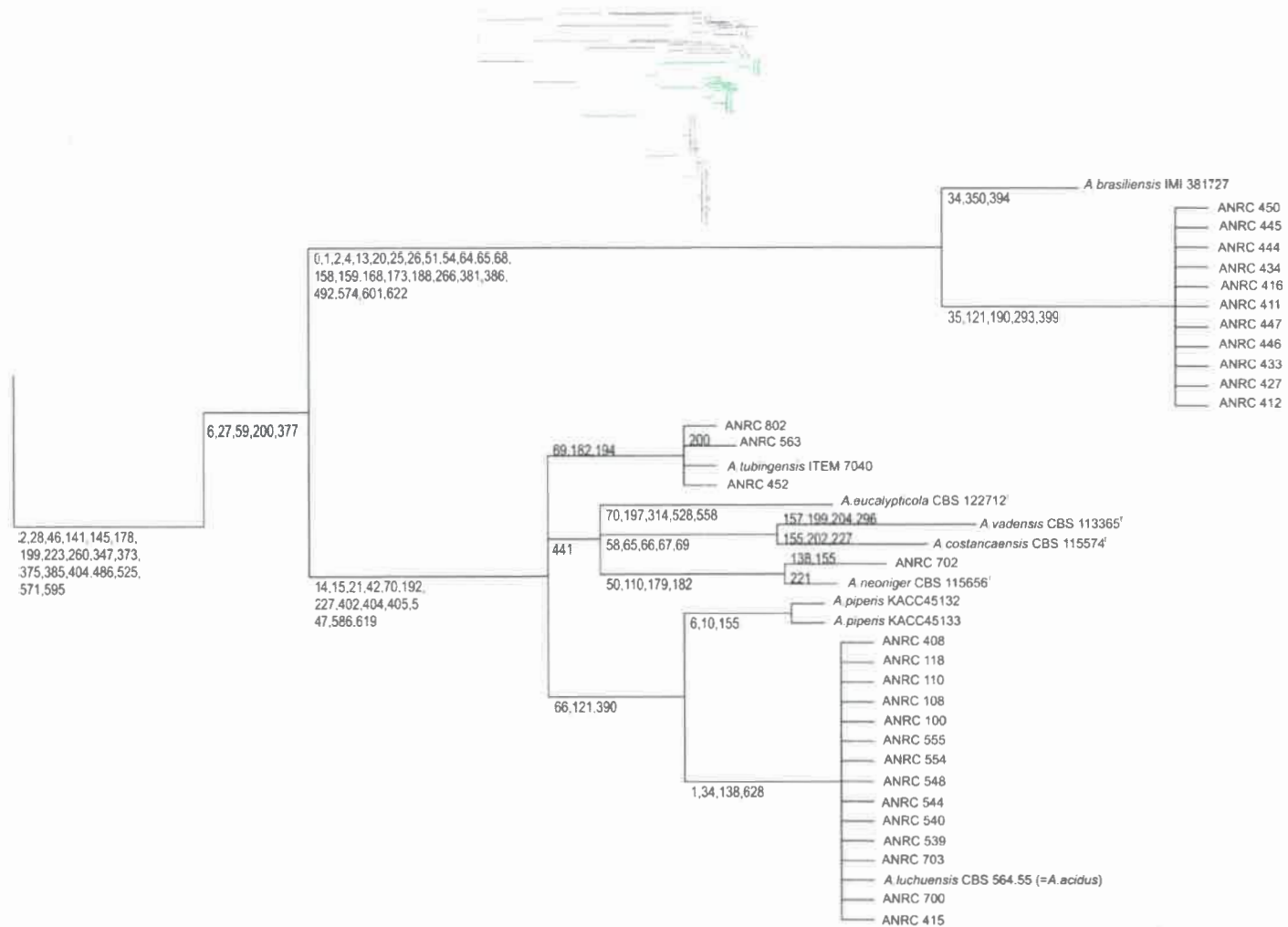


Figura V.29. Mapa de sinapomorfias comunes de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados. En la parte superior de las ramas se muestra los caracteres sinapomorficos.

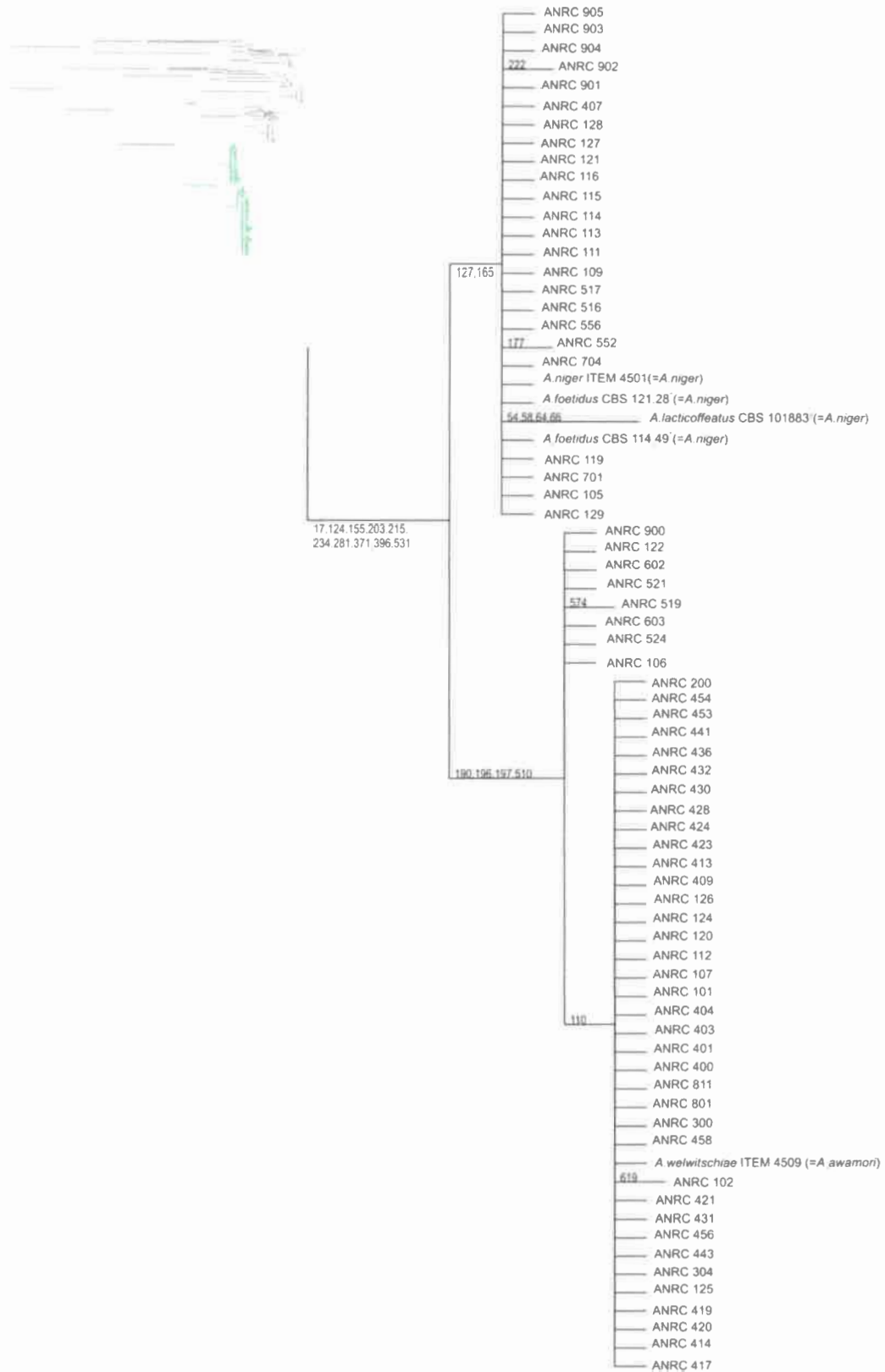


Figura V.29. Mapa de sinapomorfias comunes de los 6 árboles igualmente parsimoniosos encontrados. En la parte superior de las ramas se muestra los caracteres sinapomorficos.

A partir de la lectura de este mapa se puede dilucidar los caracteres y los estados de esos caracteres que permiten establecer las relaciones filogenéticas (Anexo VIII.2). Por ejemplo, para el caso de las especies crípticas *A. niger*/*A. welwitschiae* se muestran en la tabla V.8 los nodos del consenso (con caracteres y estados) (Figura V.29) que permiten la monofilia de los grupos.

Tabla V.8. Nodos del consenso que permiten la monofilia de las especies crípticas *A. niger*/*A. welwitschiae*.

Nodo	Especie	Para todos los árboles	Para algunos árboles
145	<i>A. welwitschiae</i>	Carácter 190: C --> T Carácter 196: C --> T Carácter 197: G --> T Carácter 510: C --> T	Carácter. 189: T --> C
151	<i>A. niger</i>	Carácter 127: T --> A Carácter 165: C --> T	

Al igual que lo informaron Varga y col. (2011), los datos de secuencia indican también que tanto las cepas *A. foetidus* (CBS 114.49 = NRRL 341; CBS 121.28), y *A. lacticoffeatus* son sinónimos de *A. niger*, mientras que *A. coreanus* (Yu y col., 2004) es sinónimo de *A. foetidus* var. *acidus* (actualmente nombrado *A. luchuensis* por Hong y col., 2013).

Sólo el subgrupo de *A. niger* es conocido por contener especies productoras de ocratoxina A y fumonisinas. En el presente estudio sólo una cepa (0,63%) (*A. welwitschiae* ANRC 104) que se agrupó dentro del subgrupo Ia fue capaz de producir niveles detectables de ocratoxina A (Figura V.27a).

El subgrupo Ib (100 % de soporte) incluyó 14 cepas que se agruparon junto con la cepa de referencia de *A. luchuensis* CBS 565.65 (= *A. acidus* CBS 565.65) (86% de soporte) y 3 cepas que se agruparon con la cepa de referencia *A. tubingensis* ITEM 7040 (96% de soporte). La especie *A. acidus* (previamente conocido como *A. foetidus* var. *pallidus* y *A. foetidus* var. *acidus*) ha sido nuevamente validada por Vargas y col. (2011) en base a datos fisiológicos y moleculares. Dicha especie es frecuentemente aislada de hojas de té (Mogensen y col., 2009) y también ha sido identificada en casos de aspergilosis humana (Alcazar-Fuoli y col., 2009).

El subgrupo Ic (100% de soporte) incluyó 11 cepas aisladas de maní, que se agruparon junto con la cepa de referencia de *A. brasiliensis* CBS 101740^T formando un clado monofilético (Figura V.28). Es de destacar que mediante marcadores ISSR, estas 11 cepas también formaron un grupo separado del resto de las especies del agregado *A. niger* con altos valores de soporte (100%) y mostrando un 46% de similitud con las especies *A. niger/A. awamori* (Figura V.22). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que estas cepas se separan de otros *Aspergillus* negros usando todas las herramientas moleculares utilizadas. Estos resultados están de acuerdo a lo informado por Varga y col. (2007) quienes informan que la especie *A. brasiliensis* forma un clado monofilético apoyado por altos valores de soporte basado en la secuenciación de los genes ITS, β -tubulina y calmodulina, y también forma un grupo bien definido utilizando el algoritmo UPGMA en base a datos obtenidos a partir de AFLP. *Aspergillus brasiliensis* sólo ha sido aislado de suelo de Brasil, Australia, Estados Unidos, Holanda y a partir de uvas en Portugal (Vargas y col., 2007). Recientemente Castrillo y col. (2013) informaron la presencia de esta especie en yerba mate en Argentina, aunque, debido a la metodología de identificación que los autores usaron, no permitirían asegurar la categorización de los aislados pertenecientes al agregado *A. niger*. Los autores usaron la secuenciación de la región ITS del ADNr para confirmar la identidad de las cepas y a partir de los resultados obtenidos, todos los integrantes del agregado *A. niger* se agruparon en un único clado monofilético sin resolución de las distintas especies. Por otro lado, las herramientas de clasificación morfológica no son las más adecuadas ya que existe superposición de características lo cual no permitiría la diferenciación dentro de este complejo grupo. Por lo tanto, este grupo de 11 cepas son el primer reporte confirmado de *A. brasiliensis* en Argentina.

En la tabla V.9 se muestra una lista de sinapomorfias comunes en los nodos del consenso. Las sinapomorfias del nodo 155 (Figura V.28) sugieren que las 11 cepas aisladas en el presente estudio evolucionaron a partir de un ancestro común, existiendo variaciones con respecto a las cepas de referencia, que bien podrían ser variaciones intraespecíficas dentro de la especie *A. brasiliensis* o sugerir que podría tratarse de una especie filogenética críptica. Para confirmar esto se deberían analizar bajo el criterio de reconocimiento de especies bajo concordancia filogenética al menos otros dos genes.

Otro clado principal (Clado II) incluyó a las especies pertenecientes a la Serie Carbonaria (*A. carbonarius*, *A. ibericus*, *A. sclerotioniger* y *A. sclerotiiicarbonarius*). Dichas especies se caracterizan por presentar conidios relativamente grandes y dos

de ellas, *A. carbonarius* y *A. sclerotioniger*, son capaces de producir ocratoxina A (Figura V.15). Además este clado incluyó cepas (ANRC 502, ANRC 514, ANRC 601 y ANRC 559) previamente identificados como *A. carbonarius* por caracteres morfológicos y cebadores específicos CARBO1/2, que se agruparon junto con *A. carbonarius* ITEM 4503 (100 % de soporte). Todas las cepas de *A. carbonarius* tuvieron idéntica secuencia del gen de la calmodulina a la cepa de referencia. Este resultado está de acuerdo con el alto grado de similitud (82 %) obtenido por análisis de conglomerados basándose en los perfiles ISSR, confirmando la falta de variabilidad molecular dentro de *A. carbonarius*. Estos resultados también están de acuerdo con los de Abarca y col. (2004) y Samson y col. (2004). El bajo nivel de polimorfismo revelado por ISSR y la falta de variabilidad nucleotídica observada en la secuencia calmodulina sugieren una relación muy estrecha entre las cepas que comparten un ancestro común productor de OTA.

Tabla V.9. Nodos del consenso que permiten la monofilia de las especies crípticas *A. niger/A. awamori*.

Nodo	Clado	Para todos los árboles	Para algunos árboles
156	<i>A. brasiliensis</i>	Carácter 0: T --> A Carácter 1: G --> A Carácter 2: A --> T Carácter 4: C --> A Carácter 13: A --> G Carácter 20: T --> A Carácter 25: G --> A Carácter. 26: A --> G Carácter 51: G --> A Carácter 54: A --> G Carácter 64: T --> C Carácter 65: T --> C Carácter 68: C --> G Carácter 158: A --> G Carácter. 159: T --> A Carácter. 168: G --> A Carácter. 173: T --> C Carácter. 188: T --> C Carácter. 266: T --> C Carácter. 381: G --> A Carácter. 386: T --> G Carácter. 492: C --> T Carácter. 574: C --> T Carácter. 601: T --> C Carácter. 622: C --> T	Carácter. 209: A --> G
155	ANRC 412, 427, 433, 446, 447, 411, 416, 434, 444, 445, 450	Carácter 35: T --> C Carácter 121: C --> A Carácter 190: C --> T Carácter 293: C --> T Carácter 399: T --> C	
47	<i>A. brasiliensis</i> IMI 381727	Carácter. 34: T --> A Carácter. 350: G --> A Carácter. 394: G --> A	

El clado II también incluyó las cepas ANRC 500 y ANRC 547 que agruparon junto con *A. ibericus* ITEM 4776 (100% de soporte). Estas cepas también mostraron baja similitud con la cepa de referencia de *A. carbonarius* A2034 usando ISSR y no amplificaron con los cebadores específicos de *A. carbonarius*, además de no ser productoras de OTA. Es por esto que estas cepas se identificaron como *A. ibericus*. *Aspergillus ibericus* se aisló y describió por primera vez en España y Portugal (Serra y col., 2006) y, este es el primer reporte de la presencia de esta especie fuera de la Península Ibérica (países mediterráneos). Cabe aclarar que la especie *A. sclerotii carbonarius* formó un grupo hermano junto con *A. ibericus* (valor de soporte 80%) de *A. carbonarius* y *A. sclerotioniger* (valor de soporte 73%) (Figura V.27c), coincidiendo la monofilia del grupo con la capacidad de producir o no ocratoxina A (Figura V.28). En la tabla V.10 se muestra la lista de sinapomorfias de los nodos del consenso implicados, que permiten la monofilia de los grupos:

Tabla V.10. Nodos del consenso que permiten la monofilia de las especies pertenecientes a la Serie Carbonaria

Nodo	Especie	Para todos los árboles
168	<i>A. carbonarius</i> y <i>A. sclerotioniger</i>	Carácter 110: T --> C
		Carácter 115: C --> T
		Carácter 376: T --> C
		Carácter 531: C --> T
		Carácter 543: G --> T
177	<i>A. ibericus</i> y <i>A. sclerotii carbonarius</i>	Carácter. 51: G --> A
		Carácter. 381: G --> A
		Carácter. 388: C --> G
		Carácter. 407: G --> A
		Carácter. 564: C --> T

Todas las especies uniseriadas pertenecen al clado *A. aculeatus* (IV), que agrupa a nueve especies (Figura V.27c). En este clado se incluyeron las cepas ANRC 529, ANRC 528, ANRC 545 y ANRC 549 aislados de pasas, que se agruparon junto con la cepa de referencia *A. japonicus* ITEM 7034 (100% de soporte). Además incluyó 3 cepas (ANRC 410, ANRC 426 y ANRC 429) aisladas de maní, que se agruparon junto con la cepas de referencia *A. uvarum* ITEM 4834 (100% de soporte) formando un

grupo monofilético (Figura V.28). Estas agrupaciones también se encontraron en los dendrogramas de UPGMA basados en marcadores ISSR (Figura V.22; Figura V.26). De esta forma el análisis de parsimonia confirmó el agrupamiento obtenido por ISSR, siendo éste el primer reporte de esta especie en Argentina. Perrone y col. (2008) describieron la especie de *A. uvarum* e informaron que sólo se aísla a partir de uvas procedentes de Portugal, Italia, Francia, Israel, Grecia y España. Recientemente Jurjević y col. (2012) aislaron también a esta especie a partir de muestras de aire.

Aspergillus ellipticus y *A. heteromorphus* formaron otro clado (III), además de *A. homomorphus* que formó un clado distinto junto con *A. saccharolyticus* (V) (Figura V.27c).

V.6. Diseño de cebadores específicos de especie

A partir de los 12 cebadores ISSR que se seleccionaron para analizar la variabilidad genética entre las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* durante la optimización del protocolo, se encontraron bandas polimórficas únicas en las distintas especies evaluadas, las cuales podrían representar sitios blancos para el posible desarrollo de cebadores específicos de especie.

En un principio, se seleccionaron aquellos fragmentos considerados específicos de especies mayores a 400 pb, se escindieron del gel de agarosa y se purificaron usando columnas comerciales para purificación de ADN siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta manera, no se logró recuperar productos de ADN con niveles cuantificables por fluorometría. Por este motivo, se decidió que, luego de cortar la banda específica del gel se disolvieran en agua destilada estéril y se reamplificaran usando las mismas condiciones de amplificación iniciales descritas en el punto III.5.1.a. De esta manera, no se obtuvo un único fragmento tal como se esperaba sino que se obtuvieron múltiples fragmentos. Por lo tanto, se cambiaron las condiciones del programa del termociclador (tiempos y temperaturas) y la composición de la mezcla de reacción descritas en el punto III.6.1.a. Usando dichas modificaciones tampoco se logró obtener un único fragmento en ninguno de los casos, por lo que se pensó en la posibilidad de que los fragmentos seleccionados podrían contener más de una repetición en tándem, complementario a los cebadores en cuestión. Debido a esto, se decidió continuar trabajando con fragmentos menores a 400 pb con las modificaciones anteriormente descritas. De esta manera se logró obtener una única banda con el mismo tamaño en pares de bases de los fragmentos de interés escindidos del gel (Figura V.30). Dichos fragmentos fueron clonados y secuenciados.

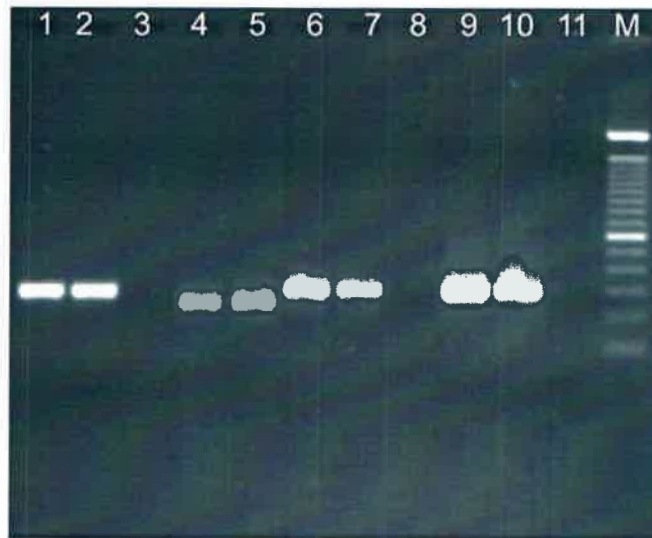


Figura V.30. Bandas polimórficas únicas de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* utilizando diferentes cebadores ISSR. Líneas 1-2: fragmento de aproximadamente 300 pb de *A. japonicus* ITEM 7034 utilizando el cebador ISSR5; Línea 3: control negativo sin ADN; Líneas 4-5: fragmento de aproximadamente 250 pb de *A. ibericus* ANRC 500 utilizando el cebador ISSR2; Líneas 6-7: fragmento de aproximadamente 300 pb de *A. aculeatus* ITEM 7046 utilizando el cebador ISSR2; Línea 8: control negativo sin ADN; Líneas 9-10: fragmento de aproximadamente 300 pb de *A. luchuensis* ANRC 703, utilizando el cebador ISSR6; Línea 11: control negativo sin ADN; M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen).

V.6.1. PCR directo de colonia

Con el objetivo de seleccionar colonias que hayan incorporado vectores clonados con los fragmentos de interés se realizó una PCR directa de 2 colonias de cada clon usando los cebadores M13F y M13R (Figura V.31). La longitud en pares de bases del producto resultante de estos cebadores en el vector sin clonar fue de 251 pb y teniendo en cuenta que los fragmentos de interés analizados oscilaban entre 250 y 300 pb aproximadamente, el producto esperado de la PCR directo de colonia oscilaría entre 501-551 pb, aproximadamente.



Figura V.31. PCR directo de colonia utilizando los cebadores M13F y M13R de 4 clones conteniendo fragmentos específicos de especie en el vector p-GEM T easy. M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen); Línea 1-2: fragmento de aproximadamente 550 pb de *A. japonicus*; Línea 3-4: fragmento de aproximadamente 550 pb de *A. aculeatus*; Línea 5: fragmento de aproximadamente 550 pb de *A. luchuensis*; Línea 6: fragmento de aproximadamente 250 pb (sin fragmento clonado); Líneas 7-8: fragmento de aproximadamente 500 pb de *A. ibericus*; Línea 9: control negativo sin ADN.

V.6.2. Reacción de clivaje

Las reacciones de clivaje se realizaron con la enzima de restricción *EcoRI* con el objetivo de comprobar el clonado y a su vez de volver a evidenciar el tamaño de los fragmentos de interés. Todos, a excepción de unos de los plásmidos clonados con el fragmento de *A. acidus*, liberaron un fragmento del tamaño esperado (Figura V.31). Cabe destacar que el plásmido que no liberó el fragmento, tampoco amplificó el fragmento esperado con los cebadores M13 cuando se les realizó la PCR directo de colonia (Figura V.32).

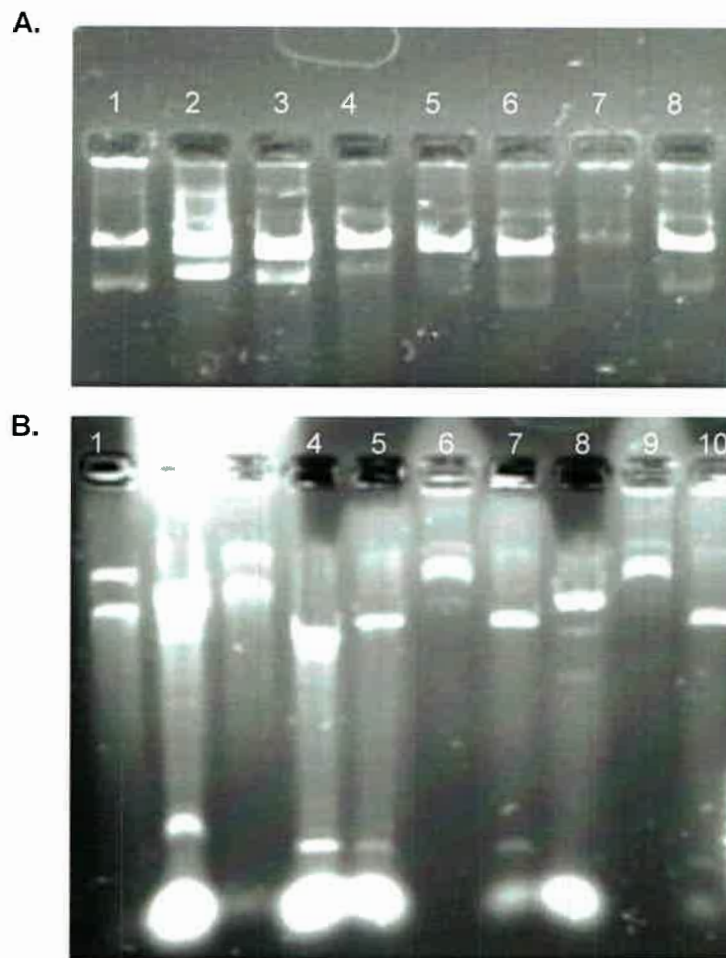


Figura V.32. Extracción de plásmido y reacción de clivaje utilizando la enzima *EcoRI*. **A)** Línea 1-2: plásmido clonado con fragmento de *A. japonicus*; Líneas 3-4: Plásmido clonado con fragmento de *A. aculeatus*; Líneas 5-6: Plásmido clonado de *A. luchuensis*; Líneas 7-8: Plásmido clonado de *A. ibericus*. **B)** Línea 1: Plásmido clonado con *A. japonicus*; Línea 2: Reacción de clivaje de plásmido clonado de *A. japonicus*; Línea 3: Plásmido clonado con *A. aculeatus*; Líneas 4-5: Reacción de clivaje de plásmido clonado de *A. aculeatus*; Línea 6: Plásmido clonado con *A. luchuensis*; Líneas 7-8: Reacción de clivaje de plásmido clonado de *A. acidus*. Línea 9: Plásmido clonado con *A. ibericus*; Línea 10: Reacción de clivaje de plásmido clonado de *A. ibericus*.

V.6.3. Análisis de secuencias de los fragmentos específicos

La estrategia usada fue la adquisición a partir de los perfiles ISSR de secuencias específicas de ADN para utilizarlas como sitios blancos para el diseño de cebadores, que proporcionen una forma rápida y conveniente de detección específica de las diferentes especies de *Aspergillus* sección *Nigri* contaminantes de alimentos.

Los datos de la secuencias de las bandas obtenidas se alinearon con el programa BioEdit versión 4.7.8n y se compararon con la base de datos no redundante del GenBank. Los resultados de la búsqueda se muestran en la Tabla V.11. A partir de las secuencias obtenidas de las bandas monomórficas de especie, se diseñaron cebadores específicos con el programa Primer 3 (Tabla V.12) (Figura V.33; Figura V.34; Figura V.35) y se sintetizaron a fin de comprobar la especificidad y sensibilidad de los mismos.

Tabla V.11. Resultado de la búsqueda de BLAST.

Banda Monomórfica de especie	Tipo de Búsqueda	Descripción del acierto	Máximo Puntaje	Cobertura de la secuencia	E valor	Identidad	Número de Acceso
<i>A. luchuensis</i>	Megablast	<i>Aspergillus niger</i> contig An05c0030, genomic contig	137	82%	4,00E-29	91%	AM270103.1
<i>A. japonicus</i>	Blastn	<i>Amborella trichopoda</i> chromosome mitochondrion, complete sequence	44.6	10%	0.50	96%	KF754803.1
		PREDICTED: <i>Latimeria</i> <i>chalumnae</i> nidogen 1 (NID1), partial Mrna	42.8	17%	1.7	82%	XM_006006822.1
<i>A. ibericus</i>	Megablast discontinuo	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 FAD binding domain protein, mRNA	122	54%	2,00E-24	85%	XM_001399734.2
		<i>Aspergillus niger</i> contig An02c0190, genomic contig	122	54%	2,00E-24	85%	AM270014.1
		<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 FAD binding domain protein (AFUA_3G10680), partial mRNA	91,5	47%	3,00E-15	81%	XM_749458.1

Mezcla de reacción de PCR optimizada (para una reacción): 0,2 mM dNTPs (Promega), Buffer PCR 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8.3), 1,25 U *Taq* DNA polimerasa (Promega), 0,2 μ M cebador (Tabla V.12), 1,5 mM de Mg Cl₂ y 2 μ l de ADN templado; en un volumen final de 20 μ l.

Programa de PCR: 1 ciclo a 94° C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94° C por 1min, 57° C por 50 s, 72° C por 1 min. Se realizó una extensión final de 5 min a 72° C y se mantuvo a 4° C por 10 min.

Tras la optimización del ensayo y condiciones de PCR, se comprobó la especificidad de los cebadores usando todas las especies de *Aspergillus* sección *Nigri* y otras especies fúngicas que co-habitan en los sustratos analizados (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.). Bajo las condiciones óptimas de reacción, sólo el par de cebadores Fibe/Ribe pudo amplificar un único fragmento del tamaño de pares de bases esperado y no se observaron reacciones cruzadas con otras especies fúngicas (Figura V.36) (Tabla V.12). La sensibilidad de la técnica permitió obtener un producto de amplificación hasta una concentración mínima de 0,01 ng/ μ l de ADN total (Figura V.37).

Los resultados obtenidos demostraron que los cebadores SCAR (Fibe/Ribe) pueden utilizarse para identificar inequívocamente a *A. ibericus*. Dicho marcador es de gran valor en estudios ecológicos y epidemiológicos de especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, ya que provee una herramienta útil para discriminar a *A. ibericus* de la especie estrechamente relacionada, *A. carbonarius*, además de otros patógenos fúngicos de plantas, incluyendo diferentes especies de *Aspergillus* spp. Debido a que *A. carbonarius*, es conocido por producir altos niveles de OTA, su delimitación con *A. ibericus* es muy importante para evitar una sobreestimación de los riesgos de contaminación y toxicológicos. Además, la incapacidad de *A. ibericus* de producir OTA es interesante desde un punto de vista biotecnológico debido a que muchos metabolitos con valor comercial se producen por otras especies de la sección. Otra cualidad importante del marcador es su sencillez, rapidez y sensibilidad. Las especies fúngicas, en especial las especies de *Aspergillus*, presentan una diversidad considerable, lo cual hace que sea más difícil asignar la identidad taxonómica de los aislados en este tipo de poblaciones (Perrone y col., 2007).

Los demás pares de cebadores no presentaron buena especificidad ya que se observaron reacciones cruzadas con especies emparentadas dentro de *Aspergillus* sección *Nigri* (datos no mostrados).

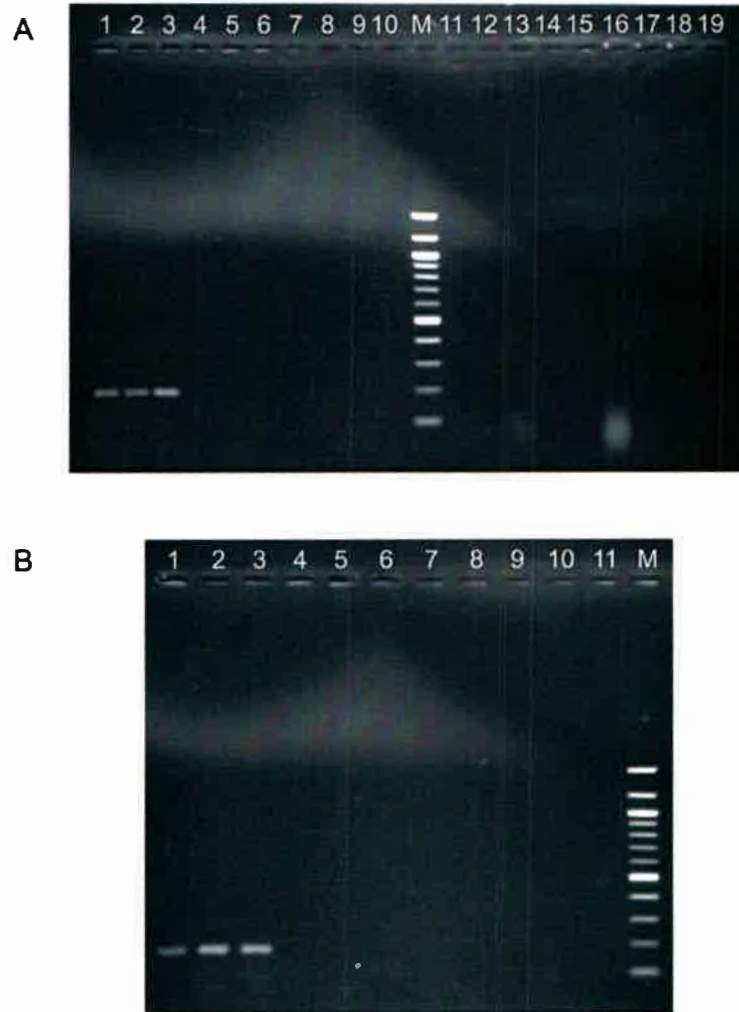


Figura V.36. Productos de amplificación para evaluar la especificidad del método Fibe/Ribe (189 pb). **A)** Línea 1-3: *A. ibericus* ITEM 4776, ANRC 500, ANRC 547; Línea 4-10: *A. carbonarius* ANRC 501, 502, 514, 558, 559, 601, A2034; M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder New England Biolabs); Línea 11: *A. japonicus* ITEM 7034; Línea 12: *A. aculeatus* ITEM; Línea 13: *A. uvarum* ITEM 4834; Línea 14: *A. niger* ANRC 704; Línea 15: *A. tubingensis* ANRC 452; Línea 16: *A. welwitschiae* ANRC 524; Línea 17: *A. brasiliensis* ANRC 412; Línea 18: *A. luchuensis* ANRC 703; Línea 19: control negativo sin ADN. **B)** Línea 1-3: *A. ibericus* ITEM 4776, ANRC 500, ANRC 547; Línea 4-6: *Alternaria oregonensis* A70, *Alternaria infectoria* 128, *Alternaria alternata* 158; Línea 7-8: *Fusarium graminearum* RCFG6001, *Fusarium proliferatum* ITEM 16395; Línea 9-10: *Aspergillus flavus* FA213, *Aspergillus parasiticus* LV3 84; Línea 11: control negativo sin ADN; M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder New England Biolabs).



Figura V.37. Productos de amplificación utilizando distintas concentraciones de ADN para evaluar la sensibilidad del método Fibe/Ribe. Línea 1-7: 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001ng, 0,0001ng, 0,00001ng de ADN de la cepa ANRC 547. Línea 8: control negativo sin ADN. M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder New England Biolabs). Línea 9-15: 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001ng, 0,0001ng, 0,00001ng de ADN de la cepa ANRC 500. Línea 16: control negativo sin ADN.

V.6.5. Múltiple PCR utilizando los cebadores CARBO1/2 y Fibe/Ribe

Existen en la actualidad una gran variedad de cebadores específicos para la detección de *A. carbonarius* (Perrone y col., 2004; Mule y col., 2006; Schmidt y col., 2004), ya que es considerada la principal especie que contribuye a la contaminación con OTA en la cadena alimentaria, pero no existen cebadores para su especie hermana *A. ibericus* la cual es morfológicamente indistinguible y no productora de dicha micotoxina.

El desarrollo de una PCR múltiple ofrece el análisis en un paso en forma rápida y específica para la diferenciación de estas especies estrechamente relacionadas. Esta metodología se puede utilizar para identificar dichas especies sin la necesidad de realizar un análisis morfológico y los consiguientes riesgos de errores de identificación. Además, este método es adecuado para investigaciones que implican un gran número

de aislados fúngicos ya que solo es necesaria una rápida extracción de ADN y la simple amplificación por PCR.

La importancia de contar con herramientas moleculares para la identificación a nivel de especies radica en lo dificultoso del reconocimiento morfológico de especies dentro de esta sección. Estos cebadores podrían ser herramientas útiles para investigaciones donde se trabaja con un gran número de aislamientos.

En conclusión, los nuevos cebadores diseñados podrían ser utilizados para detectar e identificar *A. ibericus* y junto con los cebadores CARBO1/2 (específicos de *A. carbonarius*), detectar simultáneamente ambas especies bajo las mismas condiciones de PCR (Figura V.38).



Figura V.38. Productos de amplificación para evaluar la especificidad del método múltiple PCR para la detección específica de *A. ibericus* (189pb) y *A. carbonarius* (375pb). M: Marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Promega); Línea 1: *A. ibericus* ITEM 4776; Línea 2: *A. ibericus* ANRC 500, Línea 3: *A. ibericus* ANRC 547; Línea 4: *A. carbonarius* 514; Línea 5: *A. carbonarius* A2034; Línea 6: Mezcla de DNA *A. carbonarius* A2034 y *A. ibericus* ITEM 4776; Línea 7: Control negativo sin ADN.

V.7. Resumen del estudio polifásico de 194 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*

En el Anexo VIII.7 se muestran todos los resultados obtenidos en el presente trabajo. La identificación morfológica permitió clasificar a los aislados dentro de tres grandes grupos, agregado *A. niger*, *Aspergillus* Uniseriados y Serie Carbonaria. Además se logró distinguir en base a la macromorfología a *A. lacticoffeatus* (Samson y col., 2004) y *A. sclerotioniger* (Samson y col., 2004) dentro del agregado *A. niger* y Serie Carbonaria, respectivamente. Es bien sabido que la identificación morfológica no puede ser tomada como único criterio diagnóstico en la identificación fúngica, ya que existe una superposición de caracteres que no permiten establecer límites claros para determinar la identificación a nivel de especie. Es por esto que surge la idea de establecer estudios polifásicos de clasificación incluyendo además perfil de metabolitos secundarios y el establecimiento de relaciones filogenéticas basados en el análisis de secuencias conservadas. Varga y col. (2011) realizaron una revisión de la sección *Nigri* donde reclasificaron e identificaron nuevas especies, entre ellas, demostraron que *A. lacticoffeatus* es sinónimo de *A. niger*. Chiang y col. (2011) demostraron que la macromorfología distintiva de ésta especie sólo se trata de una mutación del gen *albA* PKS, el cual es responsable de la producción de un precursor de la pigmentación además de ser también un precursor de la formación de naphtho-c-pyrones comunmente encontrados en cantidades significativas en cultivos de *A. niger*. De esta forma queda claro que si no se logra la coincidencia de todos los criterios de clasificación no se puede determinar la identidad de una especie en particular o la definición de una nueva especie.

Para contrarrestar las limitaciones que se presentan al utilizar criterios morfológicos en la identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, se considera necesario usar criterios basados en el análisis de ADN ya que pueden proporcionar una información más objetiva. La utilización de cebadores específicos permitió clasificar dentro del agregado *A. niger* a *A. tubingensis* y *A. niger/A. welwitschiae* (especies crípticas, Perrone y col., 2011), y *A. carbonarius*. Además de sugerir la posible presencia de otras especies dentro del agregado y de la Serie Carbonaria cuando no se logró la amplificación en algunos aislados. En cuanto a los cebadores JAPO1/2 (Perrone y col., 2004), se demostró que no presentan especificidad ya que amplifican a todas las especies uniseriadas incluidas en este trabajo. Esto podría ser debido a que dichos cebadores fueron diseñados cuando sólo habían sido descritas dos especies dentro de este grupo, *A. japonicus* y *A. aculeatus*,

y para muchos investigadores eran considerados la misma especie puesto que no podían diferenciarse usando algunos de los marcadores moleculares (DNA fingerprinting; análisis ITS, entre otros).

Es bien conocido que los criterios basados en análisis multigénicos son el denominado "gold standard" en la clasificación de organismos pero también es real que es una metodología demasiado cara y no convencional para ser utilizada en laboratorios de rutina de alimentos y/o clínica (Balajee y col., 2009). Es por esto que se decidió implementar una técnica de *fingerprinting* para ser usada cuando es necesario evaluar un alto número de cepas. Mediante el marcador molecular ISSR se logró agrupar por similitudes de perfiles de las bandas amplificadas a las especies Uniseriadas (*A. japonicus*, *A. uvarum*, *A. aculeatus*), Serie Carbonaria (*A. carbonarius*, *A. ibericus*) y *Aspergillus* del agregado *A. niger* (*A. niger/A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis* y *A. brasiliensis*) todos con altos valores de soporte. A fin de confirmar el poder de resolución de la técnica ISSR y establecer la identidad a nivel de especie se seleccionaron 111 cepas representativas de cada grupo para la secuenciación del gen calmodulina. De este modo se determinó la identidad de cada agrupamiento (ISSR) y la identidad de las cepas a nivel de especie. Esta última metodología fue la única que permitió separar la especie críptica *A. awamori* de *A. niger* definida por Perrone y col. (2011).

En las Figuras V39, V40, V41 y V42 se muestran las especies y el porcentaje de aislamiento según cada sustrato. Como puede observarse, en pasas de uvas las especies más frecuentemente encontradas fueron *A. tubingensis* y *A. carbonarius*, seguido por *A. luchuensis*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. welwitschiae* y *A. ibericus* (Figura V39). En cambio, en maní las especies más frecuentemente aisladas fueron *A. welwitschiae*, *A. tubingensis* y *A. brasiliensis*, seguidas por *A. uvarum*, *A. luchuensis*, *A. japonicus* y *A. niger* (Figura V40), mientras que en soja sólo se aislaron especies pertenecientes al agregado *A. niger*, siendo las más frecuentes *A. niger* y *A. welwitschiae*, seguidos por *A. luchuensis* y *A. tubingensis* (Figura V41).

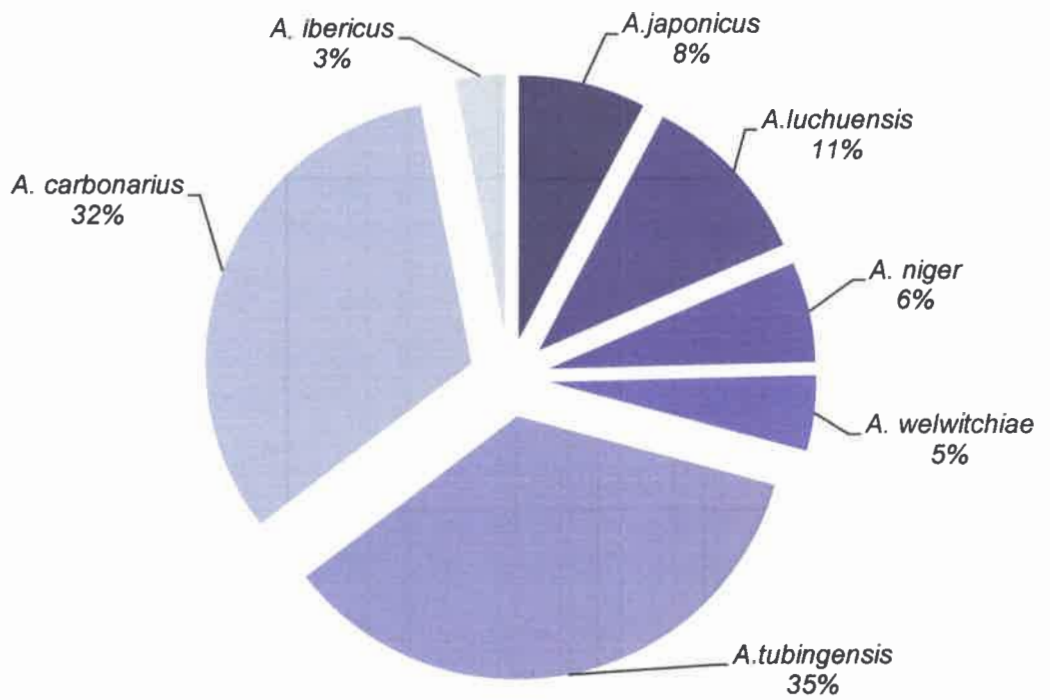


Figura V.39. Especies y porcentajes de aislamiento en pasas de uvas.

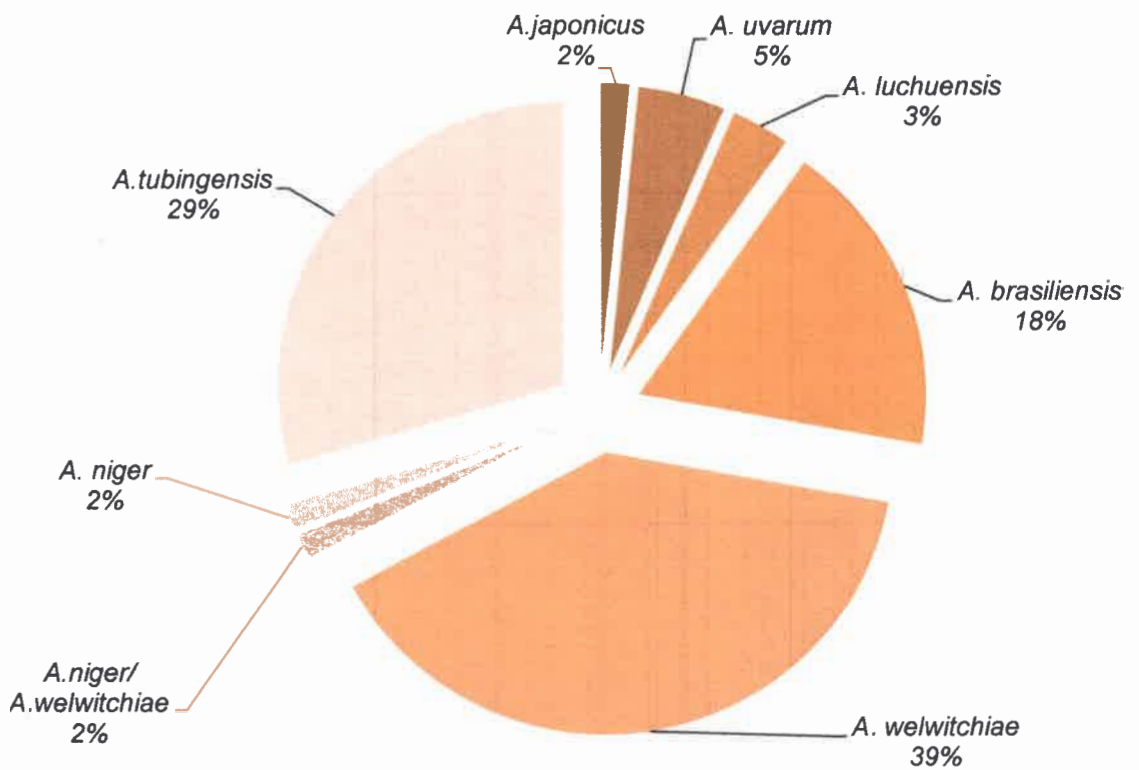


Figura V.40. Especies y porcentajes de aislamiento en maní.

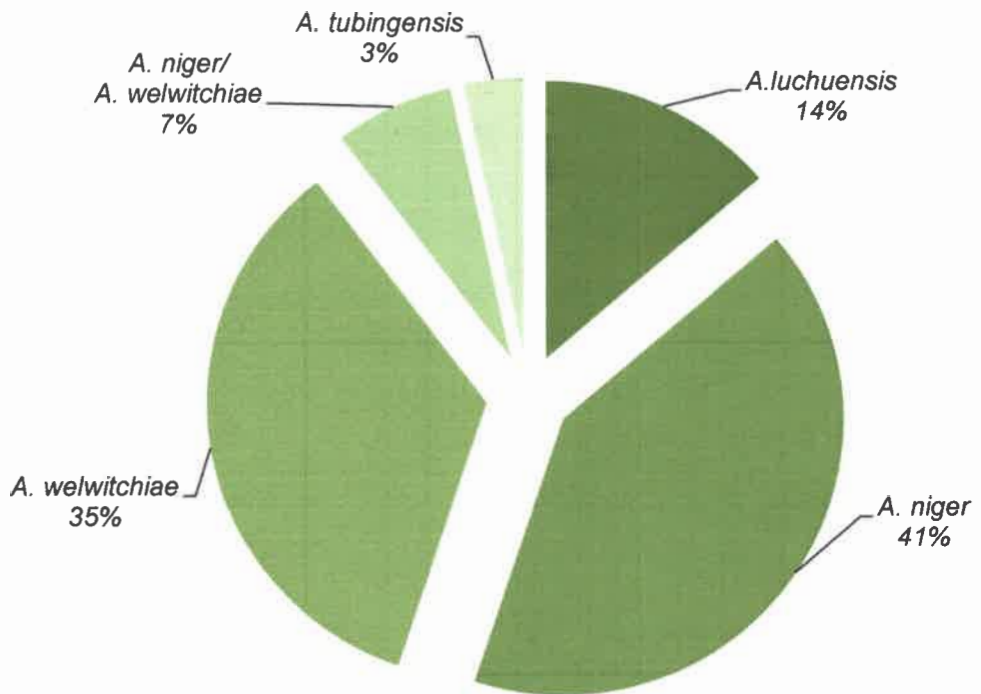


Figura V.41. Especies y porcentajes de aislamiento en soja.

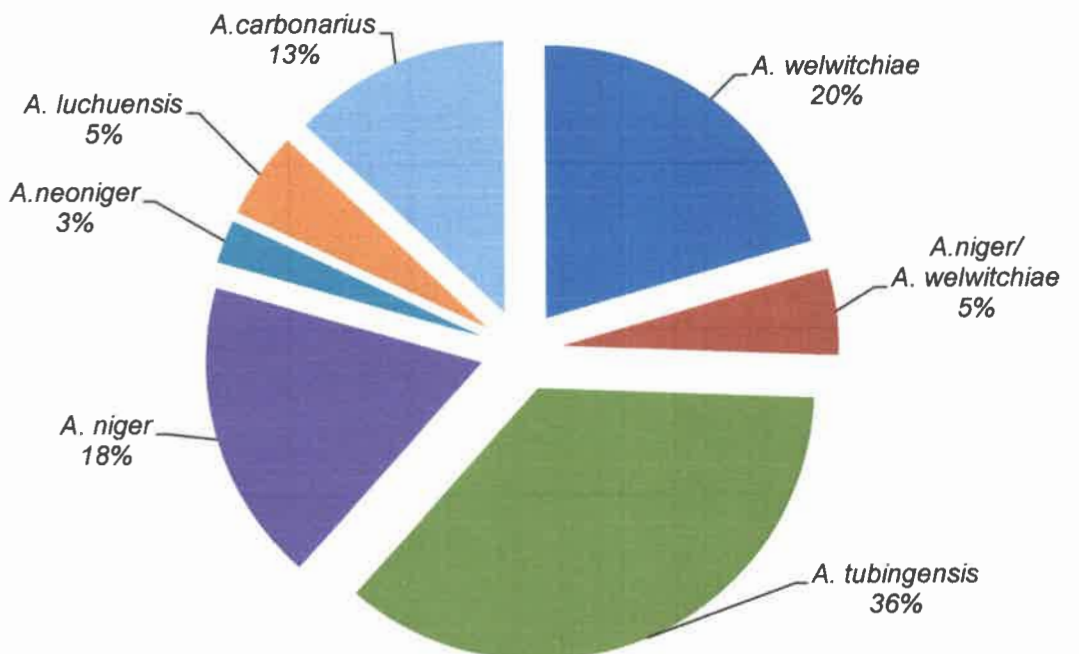


Figura V.42. Especies y porcentajes de aislamiento en almendra, pimienta, uvas, residuos de cervecera y suelo.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

- El agregado *A. niger* es el grupo de especies más frecuentemente aislado como contaminante en todos los sustratos analizados. Dependiendo de los mismos, el grupo taxonómico siguiente en orden de importancia fue Serie Carbonaria y *Aspergillus* Uniseriados en pasas de uvas; los *Aspergillus* uniseriados en maní, y en soja no se encontraron otros grupos.
- El 93% de las cepas identificadas morfológicamente como *A. carbonarius* fueron productoras de OTA, en cambio solo el 0,63% de las pertenecientes al agregado *A. niger* produjeron dicha micotoxina. Por lo tanto, se infiere que *A. carbonarius* sería la principal especie responsable de la posible acumulación de OTA en los sustratos. Los niveles de producción fueron altamente variables e inversamente proporcional a los niveles de oxígeno.
- La producción de FB₂ por algunas cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, alerta acerca de la posible presencia de esta micotoxina en los sustratos donde esta especie es un contaminante frecuente.
- Un marcador ISSR se desarrolló, el cual permitió evaluar la diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Nigri*, cuyo análisis concordó con la identidad de los aislados basada en morfología clásica y uso de cebadores específicos. A pesar que este marcador no permite la categorización taxonómica de las especies en cuestión, es una herramienta de sumo valor cuando se quiere identificar un gran número de aislados.
- El análisis de agrupamiento de los perfiles ISSR, reveló:
 - La presencia de un grupo muy homogéneo conformado por cepas que no habían amplificado con los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2, cuya categorización taxonómica por análisis de secuencias fue *A. brasiliensis*. Este grupo se aisló sólo en el sustrato maní. Este es el primer informe confirmado de esta especie en Argentina.
 - La presencia de un grupo de cepas identificadas morfológicamente como *Aspergillus* uniseriados que mostraron una alta similitud genética con la cepa de referencia *A. uvarum* ITEM 4834. La categorización

taxonómica del mismo fue confirmada por análisis de secuencias como *A. uvarum*. Este grupo se aisló sólo en el sustrato maní. Este es el primer informe de esta especie en Argentina.

- La presencia de un grupo de cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes al agregado *A. niger*, que no habían amplificado con los cebadores NIG1/NIG2 y TUB1/TUB2 y que mostraron una alta similitud genética con la cepa de referencia *A. luchuensis* ANRC 703. La categorización taxonómica de este grupo fue confirmada por análisis de secuencias como *A. luchuensis*. Este grupo se aisló en los sustratos maní, soja, pasas de uvas y café.
 - La presencia de dos cepas (ANRC 500 y 547), clasificadas morfológicamente como *A. carbonarius* y no productoras de OTA, que mostraron alta similitud genética con la cepa de referencia *A. ibericus* ITEM 4776. La categorización taxonómica fue confirmada por análisis de secuencias como *A. ibericus*. Este grupo se aisló sólo en el sustrato pasas de uvas. Este es el primer informe de esta especie en Argentina.
- Las cepas de *A. tubingensis*, *A. niger/A. welwistchiae*, *A. luchuensis* y *A. brasiliensis* fueron claramente separados por ISSR en cuatro clusters diferentes con altos valores de soporte.
 - Los agrupamientos generados por los perfiles de banda ISSR no permitieron discriminar entre las cepas con diferente perfil toxicogénico, origen geográfico y/o sustrato.
 - El análisis filogenético sugiere que las 11 cepas categorizadas como *A. brasiliensis* evolucionaron a partir de un ancestro común hipotético no compartido con la cepa de referencia evaluada. Esto podría deberse a variaciones intraespecíficas dentro de la especie *A. brasiliensis* o bien tratarse de especies filogenéticas crípticas dentro del clado de *A. brasiliensis*.
 - A partir de los perfiles ISSR se encontraron bandas monomórficas únicas de especie que podrían ser sitios blancos para el desarrollo de cebadores específicos de especies.

- El marcador SCAR desarrollado en el presente trabajo, utilizando los cebadores Fibe/Ribe, puede distinguir claramente *A. ibericus* de la especie estrechamente relacionada *A. carbonarius* de forma rápida, confiable y de bajo costo. Esta distinción es de suma importancia para evitar una sobreestimación de los riesgos de contaminación y toxicológicos.



VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, 64: 903–906.
- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Castella G, Cabañes FJ (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.
- Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabañes FJ (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 33–49.
- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F & Cabañes FJ (1997). New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *Journal of Food Protection*, 60: 1580–1582.
- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2650–2652.
- Abbas HK, Cartwright RD, Shier WT, Abouzied MM, Bird CB, Rice LG, Ross PF, Sciombato GL, Meredith FI (1998). Natural occurrence of fumonisins in rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Plant Disease*, 82: 22–25.
- Abbas HK, Riley RT (1996). The presence and phytotoxicity of fumonisins and AAL toxin in *Alternaria alternata*. *Toxicon*, 34: 133–136.
- Accensi F, Abarca ML, Cano J, Figuera L, Cabañes FJ (2001). Distribution of Ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 365–370.
- Accensi F, Cano J, Figuera L, Abarca ML, Cabañes FJ (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 191–196.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2009). Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 4514–4517.
- Al-Musallam A. (1980). Revision of the black *Aspergillus* species. Ph.D. Thesis. University of Utrecht, The Netherlands.
- Alves-Santos F, Brisa R, Garcia-Sanchez MA, Eslava AP, Diaz-Minguez JM (2002). A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, 92: 237-244.

- Astoreca A, Magnoli C, Barberis C, Chiacchiera SM, Combina M, Dalcero A (2007). Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. *Science of the Total Environment*, 388: 16–23.
- 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 SE (2006). *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology*, 4: S17–S21.
- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegraki A, Wickes BL (2009). Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *Journal of Applied Microbiology*, 47: 877–884.
- Barberis MG, Giaj Merlera G, Reynoso MM, Chulze SN, Torres AM (2013). Factors affecting distribution and abundance of *Aspergillus* section *Nigri* in vineyard soils from grapevine growing regions of Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.6647.
- Bartók T, Szécsi Á, Szekeres A, Mesterházy Á, Bartók M (2006). Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 2447–2462.
- Batista PP, Santos JF, Oliveira NT, Pires APD, Motta CMS, Luna EA (2008). Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetical Research*, 7: 706–717.
- Battilani P & Pietri A (2002). Ochratoxin A in grape and wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 639–643
- Battilani P, Giorni P, Pietri A. (2003b) Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 715–722.
- Battilani P, Magan N and Logrieco A (2006). European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 2–4.

- Battilani P, Pietri A, Bertuzzi T, Languasco L, Giorni P, Kozakiewicz Z (2003a). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66: 633–636.
- Bau M, Bragulat MR, Abarca ML, Minguez S and Cabañes FJ (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grape. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 125–130.
- Bau M, Castella G, Bragulat MR, Cabañes FJ (2006). RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 313–318.
- Bellí N, Pardo E, Marín S, Farré G, Ramos AJ, Sanchis V (2004a). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 541–546.
- Blair MW, Muñoz C, Garza R and Cardona C (2006). Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 913–923.
- Bornet B. y Branchard M (2001). Non anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 209-215.
- Bossche HV, Mackenzie DWR, Cauwenbergh G (eds) (1988). *Aspergillus and Aspergillosis*. New York: Plenum Press.
- Boudra H, Le Bars P, Le Bars J (1995). Thermostability of ochatoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 1156-1158.
- Bouhet S, Le Dorze E, Peres S, Fairbrother JM, Oswald IP (2006). Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: *in vivo* and *in vitro* studies. *Food Chemical Toxicology*, 44: 1768–1773.
- Bragulat MR, Abarca ML, Accensi F, Cabañes FJ (1998). New screening method for ochratoxigenic molds in pure cultures. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22: 515.
- Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 139–144.
- Brown DW, Cheung F, Proctor RH, Butchko RAE, Zheng L (2005). Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 848–861.

- Buffier E, Susca A, Baud A, Mule G, Brengel K, Logrieco A (2007). Detection of *Aspergillus carbonarius* and other black aspergilli from grapes by DNA OLISATM microarray. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1138–1147.
- Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castella G, Minguez S, Pons A (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213–215.
- Cabañes FJ, Bragulat MR and Castellá G (2012). Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiology*, 36: 135-141.
- Castellá G, Bragulat MR, Cabanes FJ (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4707-4710.
- Castellá G, Cabañes FJ (2011). Development of a Real Time PCR system for detection of ochratoxin A-producing strains of the *Aspergillus niger* aggregate. *Food Control*, 22: 1367-1372.
- Castrillo ML, Horiński MA, Jerke G (2013). Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. *Revista Argentina de Microbiología*, 45: 110-113.
- Chen C, Zhang W, Gao WW, Chen WW (2010). Using a sequence characterized amplified region (SCAR) marker for detection of *Bacillus* strain TS02 sprayed on strawberry plants to bio-control powdery mildew in fields. *African Journal of Biotechnology*, 9: 6049-6055.
- Chiang Y-M, Meyer KM, Praseuth M, Baker SE, Bruno KS, Wang CCC (2010). Characterization of a polyketide synthase in *Aspergillus niger* whose product is a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and naphtho- γ -pyrone. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 430–437.
- Chiotta ML, Ponsone ML, Combina M, Torres AM, Chulze SN (2009). *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 137-141.
- Chiotta ML, Reynoso MM, Combina M, Torres AM, Chulze SN (2010). Molecular characterization and toxigenic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from main grape-growing regions in Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 445–454.

- Chiotta ML, Susca A, Stea G, Mulè G, Perrone G, Logrieco A, Chulze SN (2011). Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 171–176.
- Choi YE, Ahn CH, Kim BB, Yoon ES (2008). Development of species specific AFLP-derived SCAR marker for authentication of *Panax japonicus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31: 135-138.
- Chulze SN, Magnoli CE, Dalcero AM (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: S5–S9.
- Ciocchetti A, Sciandone L, Durando F, Garibaldi A and Migheli Q (2001). PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Basilica* on basil. *Plant Disease*, 85: 607-611.
- Cohen S, Allasia V, Venard P, Notter S, Vernière C, Panabières F (2003). Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 791–805.
- Cooper-Driver GA, Wagner C, Kolberg H (2000). Patterns of *Aspergillus niger* var. *phoenicis* (Corda) Al-Musallam infection in Namibian populations of *Welwitschia mirabilis* Hook.f. *Journal of Arid Environments*, 46: 181–198.
- Copetti MV, Pereira JL, Iamanaka BT, Pitt JI, Taniwaki MH (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143: 67–70.
- Creppy EE (1999). Human ochratoxicosis. *Journal Toxicology-Toxin Reviews*, 18: 277–293.
- Da Rocha Rosa CA, Palacios V, Combina M, Fraga ME, De Oliveira Reckson A, Magnoli CE, Dalcero AM (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19: 408–414.
- Da Silva JB, Pozzi CR, Mallozzi MAB, Ortega EM, Corrêa B (2000). Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4352–4356.
- Dalcero A, Magnoli C, Hallak C, Chiacchiera SM, Palacio G, Rosa CAR (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 HP, Mathieu F, Lebrihi A (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 61–67
- De Vries RP, Frisvad JC, van de Vondervoort PJ, Burgers K, Kuijpers AF, Samson RA y Visser J (2005). *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black Aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 195-203.
- Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW, 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *International Journal of Organic Evolution*, 57: 2703-2720.
- Devaiah KM, Venkatasubramanian P (2008a). Development of SCAR marker for authentication of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex. Willd.) DC. *Current Science*, 94: 1306-1309
- Devaiah KM, Venkatasubramanian P (2008b). Genetic characterization and authentication of *Embelia ribes* using RAPD-PCR and SCAR marker. *Planta Medica*, 74: 194-196.
- Devi PT, Prabhakaran N, Kamil D, Borah JL and Alemayehu G (2013). Development of SCAR marker for specific detection of *Aspergillus flavus*. *African Journal of Microbiology Research*, 26: 783-790.
- Dhanya K, Syamkumar S, Sasikumar B (2009). Development and application of SCAR marker for the detection of papaya seed adulteration in traded black pepper powder. *Food Biotechnology*, 23: 97-106.
- Dinolfo MI, Stenglein SA, Moreno MV, Nicholson P, Jennins P, Salerno GL (2010). ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 483-491.
- Dixon DM, Walsh TJ (1992). Human pathogenesis. In: *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*, (Eds. Bennett JW, Klich MA), pp 249-267. Boston: Butterworth-Heineman.
- Dobson A, O'Callaghan J (2004). Detection of ochratoxin A producing fungi. Patent No. WO 2004/072224 A2.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980). Compendium of soil fungi. Vol. 1, p.859. *Academic Press*, London, UK.
- Edwards SG, O'Callaghan J, Dobson ADW (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, 106: 1005-1025.
- 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. *The EFSA Journal*, 365: 1–56.

- Elbakali AM, Lilja A, Hanutula J, Martin MP (2003). Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS fingerprinting. *Phytopathologia Mediterranea*, 42:167–176.
- Frisvad JC, Andersen B, Thrane U (2007b). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, 112: 231-240.
- Frisvad JC, Bridge PD, Arora DK (eds.) (1998). Chemical fungal taxonomy. Marcel Dekker, New York.
- Frisvad JC, J Frank M, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50: 23–43.
- Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA, Nielsen KF (2011). Fumonisin and ochratoxin production in Industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0023496.
- Frisvad JC, Larsen TO, Vries R de, Meijer M, Houbraken J, Cabañes FJ, Ehrlich K, Samson RA (2007a). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, 59: 31-37.
- Frisvad JC, Nielsen FK, Samson RA (2006). Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxinogenic fungi associated with foods and feeds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571: 33–46.
- Fungaro MHP, Vissotto PC, Sartori D, Vilas-Boas LA, Furlaneto MC, Taniwaki MH (2004). A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology*, 49: 123–127.
- Gallo A, Bruno KS, Solfrizzo M, Perrone G, Mulè G, Visconti A, Baker SE (2012). New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 8208-8218.
- Gams W, Christensen M, Onions AHS, Pitt JI, Samson RA (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson R.A. and Pitt JI. (eds), *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, New York, New York, USA, pp. 55–64.
- Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG (1991). Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, 12: 1247–1251.

- Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J & Muller FM (2003). Molecular typing for fungi – a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection*, 9: 172–185.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24: 774–786.
- Gonzalez-Salgado A, Patiño B, Vazquez C, Gonzalez-Jaen MT (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 353–361.
- Griffin GJ & Garren KH (1976). Colonization of rye green manure and peanut fruit debris by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* group in field soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 28-32.
- Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ (2002). Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11: 309–320.
- Haller A von (1968). *Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata*. Bernae.
- Hamari Z, Kevei F, Kovács E, Varga J, Kozakiewicz Z, Croft JH (1997). Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 72: 337–347.
- Hamari Z, Pfeiffer I, Ferenczy L, Kevei F (1999). Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 75: 225–231.
- Hantula J and Müller MM (1997). Variation within *Cremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Mycological Research*, 101: 169-175.
- Hantula J, Dusabenyagasani M and Hamelin RC (1996). Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26: 159-166.
- Hara S, Kitamoto K, Gomi K (1992). New developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Bennett, JW and Klich, MA. (Eds.), pp. 133-153. Butterworth-Heinemann, Boston, USA.
- Haschek WM, Gumprecht LA, Smith G, Tumbleson ME, Constable PD (2001). Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 109: 251–257.

- Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper S (2004). Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 198–210.
- Haugland RA, Vesper S (2002). Method of identifying and quantifying specific fungi and bacteria. US Patent No. 6,387,652.
- Hayashi M, Ujiie A, Serizawa H, Sassa H, Kakui H, Oda T and Koba T (2011). Development of SCAR and CAPS markers linked to a recessive male sterility gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica*, 180:429–436
- Heenan CN, Shaw KJ, Pitt JI (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, 1: 67–72.
- Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA (2013). *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *Plos One*, 8: 63769. doi:10.1371/journal.pone.0063769.
- Janzen DH (1977). Why fruits rot, seeds mold, and meats spoils. *American Naturalist*, 111: 691–713.
- Jeffrey AJ, Wilson V, Thein SL (1985a). Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 316: 67-73.
- Jeffrey AJ, Wilson V, Thein SL (1985b). Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 316: 76-79.
- Jimenez-Gasco MM, Jimenez-Diaz RM (2003). Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. *Phytopathology*, 93:200-209
- Jimenez-Gasco MM, Pérez-Artés E, Jimenez-Diaz RM (2001). Identification of pathogenic races 0,1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology*, 107: 237-248.
- Joosten HMLJ, Goetz J, Pittet A, Schellenberg M, Bucheli P (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 39–44.
- Jurjević Z, Peterson SW, Stea G, Solfrizzo M, Varga J, Hubka V and Perrone G (2012). Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. *IMA Fungus*, 2: 159–173.

- Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability (outlines version 7). *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.
- Kevei F, Hamari Z, Varga J, Kozakiewicz Z, Croft JH (1996). Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 59–66.
- Khalidi N, Wolfe KH (2011). Evolutionary origins of the fumonisin secondary metabolite gene cluster in *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus niger*. *International Journal of Evolutionary Biology*, Article ID 423821, doi:10.4061/2011/423821.
- Kim EK, Kim YB, Shon DH, Ryu D, Chung SH (1998). Natural occurrence of fumonisin B₁ in Korean rice and its processed foods by enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Science Biotechnology*, 7: 221-224.
- Kim SC, Jung YH, Kim M, Jang KC (2008). Development of SCAR marker for sex identification in asparagus. In: Mulder JH, Lavrijsen PJM (eds) Proceedings of the XIth International Asparagus Symposium, 327-331.
- Klich, MA (2002). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94: 21-27.
- Kozakiewicz Z (1989). *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* 161. CAB International, Wallingford, UK.
- Kuiper-Goodman T, Scott PM (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2: 179-248.
- Kusters-van Someren MA, Kester HCM, Samson RA, Visser J (1990). Variation in pectinolytic enzymes in black aspergilli: a biochemical and genetic approach. In: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. (Samson RA, Pitt JI, eds). New York: Plenum Press: 321–334.
- Kusters-van Someren MA, Samson RA, Visser J (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black aspergilli: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, 19: 21–26.
- Ladhalakshmi D, Vijayasamundeeswari A, Paranidharan V, Samiyappan R (2009). Molecular identification of isolates of *Peronosclerospora sorghi* from maize using PCR-based SCAR marker. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 25: 2129-2135.
- Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen ME, Frisvad JC (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*, 22: 672–693.

- Latge JP (1999). *Aspergillus fumigates* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 310-350.
- Leong SL, Hocking AD, Pitt JI (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 SL, Hocking AD, Scott ES (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, Summerell B (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. *Blackwell Publishing*.
- Lieckfeldt E, Meyer W, Kuhis K, Börner T (1992). Characterization of filamentous fungi and yeasts by DNA fingerprinting and random amplified polymorphic DNA. *Belgian Journal of Botany*, 125: 226-233.
- Liu C, Liu F, Xu W, Kofoet A, Humpf HU, Jiang S (2005). Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in asparagus from Shandong province, P. R. China. *Food Additives and Contaminants*, 22: 673-676.
- Logrieco A, Doko B, Moretti A, Frisullo S, Visconti A (1998). Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in *Fusarium proliferatum* infected asparagus plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5201–5204.
- Magnoli C, Astoreca A, Ponsone L, Combina M, Palacio G, Rosa CAR, Dalcero AM (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 326–331.
- Magnoli C, Astoreca A, Ponsone ML, Fernández-Juria MG, Barberis C, Dalcero AM (2007). Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 213–218.
- Magnoli C, Violante M, Combina M, Palacio G, Dalcero A (2003). Mycoflora and ochratoxin-A producing strains of *Aspergillus* Section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 179–184.
- Mahuku GS, Jara C, Cuasquer JB, Castellanos G (2002). Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implication for resistance breeding of common bean. *Plant Pathology*, 51: 594-604.
- Mansson M, Klejnstrup MI, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gottfredsen CH, Larsen TO (2010). Isolation and NMR characterization of Fumonisin B₂ and a new Fumonisin B₆ from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 949–953.

- Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, Van der Lugt JJ (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55: 197–203.
- Marín S, Bellí N, Lasram S, Chebil S, Ramos AJ, Ghorbel A, Sanchis V (2006). Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *Journal of Food Science*, 71: M196–M200.
- Martinez-Culebras PV, 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 PV, Sempere CA, Hervás SM, 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
- Martins ML, Martins HM, Bernardo F (2001). Fumonisin B₁ and B₂ in black tea and medicinal plants. *Journal of Food Protection*, 64: 1268–1270.
- Mata MM, Taniwaki MH, Iamanaka BT, Sartori D, Oliveira ALM, Furlaneto MC, Fungaro MHP (2007). *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 148–151.
- Medina A, Mateo R, Lopez-Ocana L, Valle-Algarra FM, 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.
- Mégnégneau B, Debets F, Hoekstra RF (1993). Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics*, 23: 323–329.
- Micheli PA (1729). *Nova plantarum genera*. Florentiae.
- Mirocha CJ, Chen J P, Xie WP, Xu YC, Abbas HK, Hogge LR (1996). Biosynthesis of fumonisin and AAL derivatives by *Alternaria* and *Fusarium* in laboratory culture. In *Fumonisin in Food*; Jackson LS, DeVries JW, Bullerman LB (Eds.). Plenum Press: New York, 1996; pp 213–224.

- Mishra PK, Fox RTV, Culham A (2003). Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology*, 143:291-301.
- Mishra PK, Tewari JP, Clear RM, Turkington TK (2004). Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, 145:299-307.
- Mishra PK, Tewari JP, Clear RM, Turkington TK (2006). Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *International Microbiology*, 9: 65–68.
- 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.
- Mogensen JM, Varga J, Thrane U, Frisvad JC (2009). *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B₂. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 141–144.
- Mulé 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: S28–S34.
- Mutlu M, Boyacı FH, Göçmen M and Abak K (2008). Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD, and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *International Journal Plant Breeding Research*, 117:1303–1312.
- Naef A, Défago G (2006). Impact of Bt transgenes in overwintered maize stalk on the population structure of plant-pathogenic *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 129-143.
- Neal C, Richardson A, Hurst S, Tortorano A, Viviani A, Stevens D and Balajee S (2011). Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering. *BMC Microbiology*, 11: 203.
- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10: 5269–5273.
- Ness F, Lavellee F, Dubourdieu D, Aigle M, Dulau L (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of Sciences on Food and Agriculture*, 62: 89-94.

- Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 1225–1246
- Niessen L (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 38–46.
- Noonim P, Mahakarnchanakul W, Nielsen KF, Frisvad JC, Samson RA (2009). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from Thai coffee beans. *Food Additives and Contaminants*, 26: 94–100.
- Noonim P, Mahakarnchanakul W, Varga J, Frisvad JC and Samson RA (2008). Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1727–1734.
- O'Brien E, Dietrich DR (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35: 33–60.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41: 61–78.
- Palencia ER, Klich MA, Glenn AE, Bacon CW (2009). Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. *Journal of Microbiological Methods*, 79: 1–7.
- Palumbo JD, O'Keeffe TL, McGarvey JA (2011). Incidence of fumonisin B₂ production within *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from California raisins. *Journal of Food Protection*, 74:672–675.
- Parenicova L, Benen JAE, Samson RA, Visser J (1997). Evaluation of RFLP analysis of the classification of the selected black *Aspergilli*. *Mycological Research*, 101: 810–814.
- Parenicova L, Skouboe P, Frisvad J, Samson RA, Rossen L, ten Hoor-Suykerbuyk M, Visser J (2001). Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 521–527.
- Parenicova L, Skouboe P, Samson RA, Rossen L, Visser J (2000). Molecular tools for the classification of black aspergilli. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. (Samson RA, Pitt JI, eds). Amsterdam: Harwood Academic Publishers: 413–424.

- Pekarek E, Jacobson K, Donovan A (2006). High levels of genetic variation exist in *Aspergillus niger* populations infecting *Welwitschia mirabilis* Hook. *Journal of Heredity*, 97: 270–278.
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, 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, Radic B, Lucic A and Pavlovic M (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 754–766.
- 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, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, 115: 1138–1150.
- Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson RA (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59: 53–66.
- Perrone G, Susca A, Epifani F, Mule G (2006b). AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S22–S27.
- Perrone G, Susca A, Stea G, Mule G (2004). PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 641–649.
- Perrone G, Varga J, Susca A, Frisvad JC, Stea G, Kocsubé S, Tóth B, Kozakiewicz Z, Samson RA (2008). *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 8: 1032–1039.
- Peterson ST (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Samson RA and Pitt JI (eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 323–355.
- Pitt JI, Hocking AD (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, UK.

- Ponsone ML, Combina M, Dalcero A, Chulze SN (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
- Pradeep R, Sarla N y Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17.
- Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*, 38:237–249.
- Raper KB, Fennell DI (1965). The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Ray T, Roy SC (2009). Genetic diversity of *Amaranthus* species from the indo-gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. *Journal of Heredity*, 100: 338-347.
- Rinaldi MG (1983). Invasive aspergillosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 5: 1061-1077.
- Roberts DW, Yendol WG (1971). Use of fungi for microbial control of insects. In: Microbial Control of Insects and Mites. Burges, HS and Burges, N.W (Eds.), pp. 125-149. Academic Press, New York, USA.
- Rohlf FJ (1990). Fitting curves to outlines. In: F. J. Rohlf & F. L. Bookstein (eds), Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Spec. Publ. No. 2. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, pp. 167-177.
- Rohlf M, Obmann B, Petersen R (2005). Competition with filamentous fungi and its implication for a gregarious lifestyle in insects living on ephemeral resources. *Ecological Entomology*, 30: 556–563.
- Romero SM, Comería RM, Larumbe G, Ritieni A, Vaamonde G, Fernández Pinto V (2005). Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 43–49.
- Russell R, Paterson M (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41: 1467-1474.
- Sage L, Garon D, Seigle-Murandi F (2004). Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5764–5768.
- Saharan MS, Naef A (2008). Detection of genetic variation among Indian wheat head scab pathogens (*Fusarium* spp./isolates) with microsatellite markers. *Crop Protection*, 27: 1148–1154.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory Manual*, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samson RA (1979). A compilation of the *Aspergilli* described since 1965. *Studies in Mycology*, 18. CBS publishers, Baarn, The Netherlands.
- Samson RA, Houbroken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45–61.
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbroken J, Frisvad JC, Varga J (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59: 129-145.
- Samson RA, van Reenen-Hoekstra ES, Frisvad JC and Filtenborg O (2000). *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, The Netherlands.
- Schmidt H, Taniwaki MH, Vogel RF, Niessen L (2004). Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 899–909.
- Schwartz DC, Cantor CR (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell*, 37: 67-75.
- Serra R, Braga A, Venancio A (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156: 515–521.
- Serra R, Cabanes FJ, Perrone G, Castella G, Venancio A, Mule G, Kozakiewicz Z (2006). *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*, 98: 295–306.
- Sidhu GS (2002). Mycotoxin genetics and gene clusters. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 705–711.
- Sørensen A, Lübeck PS, Lübeck M, Nielsen KF, Ahring BK (2011). *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a new black *Aspergillus* species isolated in Denmark. *International Journal of Systematics and Evolution*, 61: 3077–3083.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.
- Storari M, Bigler L, Gessler C, Broggini GA (2012). Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. *Food Additives and Contaminants*, 29: 1450–1454.

- Susca A, Stea G, Mule G, Perrone G (2007a). Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1154–1160.
- Susca A, Stea G, Perrone G (2007b). Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded 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.
- Susca S, Proctor RH, Mule G, Stea G, Ritieni A, Logrieco A, Moretti A (2010). Correlation of mycotoxin Fumonisin B₂ production and presence of the fumonisin biosynthetic gene fum8 in *Aspergillus niger* from grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9266–9272.
- Swofford DL (2001). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA, Iamanaka BT (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 173–179.
- Téren J, Palágyi A, Varga J (1997). Isolation of ochratoxin-producing aspergilli from green coffee beans of different origin. *Cereal Research Communications*, 25: 303–304.
- Téren J, Varga J, Hamari Z, Rinyu E, Kevei F (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 134: 171–176.
- Thrane U, Andersen B, Frisvad JC, Smedsgaard J (2007). The exo-metabolome in filamentous fungi. In: Nielsen J, Hewitt J (eds.): *Metabolomics. A powerful tool in systems biology*, Springer, Berlin. *Topics in Current Genetics*, 18: 235–252.
- Tooley GA, Armstrong SM (2000). Acute increases in night-time plasma melatonin levels following a period of meditation. *Biological Psychology*, 53: 69–78.
- Tseng TC, Liu CY (1997). Natural occurrence of fumonisins in corn-based foodstuffs in Taiwan. *Cereal Research Communications*, 25: 393–394.
- Urbano GR, Taniwaki MH, Leitao MF de F, Vicentini MC (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 64: 1226–1230.
- Valero A, Begum M, Hocking AD, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V (2008). Mycelial growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* on simulated grape medium in modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 372–379.

- van den Hondel, CA, Punt PJ, van Gorcom RFM (1992). Production of extracellular proteins by filamentous fungus *Aspergillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 61: 153-160.
- van der Vossen JMBM, Hofstra H (1996). DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 35-49.
- Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G and Samson RA (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 69: 1-17.
- Varga J, Kevei F, Debets F, Kozakiewicz Z, Croft JH (1994). Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 612-621.
- Varga J, Kevei F, Fekete C, Coenen A, Kozakiewicz Z, Croft JH (1993). Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*, 97: 1207-1212.
- Varga J, Kevei F, Hamari Z, Tóth B, Téren J, Croft JH, Kozakiewicz Z (2000). Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. (Samson RA, Pitt JI, eds). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp 397-411.
- Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Man V, Tóth B (2012) Black Aspergilli and fumonisin contamination of onions purchased in Hungary. *Acta Alimentaria*, 41: 414-423.
- Varga J, Kocsubé S, Tóth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Meijer M, Samson RA (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1925-1932.
- Vega FE, Posada F, Gianfagna TJ, Chaves FC, Peterson SW (2006). An insect parasitoid carrying an ochratoxin producing fungus. *Naturwissenschaften*, 93: 297-299.
- Visser J, Suykerbuyk M, Kusters-Van Someren M, Samson R and Schaap P (1996). Classification of black Aspergilli by RFLP analysis. In: Rossen L, Rubio V, Dawson MT and Frisvad JC (eds), Fungal identification techniques, ECSC-EC-EAEC, Brussels, Belgium, pp. 194-201.
- Wadhvani K, Srivastava M (1985). *Aspergillus flavus* Link as an antagonist against aphids of crucifers. *Acta Botanica Indica*, 13: 281-282.

- Ward PP, Lo JY, Duke M, May GS, Headon DR, Connely OM (1992). Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/technology*, 10: 784-789.
- Webster J and Weber RWS (2009). Introduction to fungi. 3rd ed. Cambridge University press, New York.
- Wehmer C (1907). Zur Kenntnis einiger *Aspergillus* arten. *Centralb. f. Bakt. etc.* II, Abt. Bd. 18: 385–395.
- Whitaker C, Pammenter NW, Berjak P (2008). Infection of the cones and seeds of *Welwitschia mirabilis* by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* in the Namib-Naukluft Park. *South African Journal of Botany*, 74: 41–50.
- Wicklow DT, Dowd PF, Alfatafta AA, Gloer JB (1996). Ochratoxin A: an antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. *Canadian Journal Microbiology*, 42: 1100–1103.
- Yamada O, Takara R, Hamada R, Hayashi R, Tsukahara M, Mikami S (2011) Molecular biological researches of Kuro-koji molds, their classification and safety. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112: 233–237.
- Yokoyama K, Wang L, Miyaji M, Nishimura K (2001). Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 241–246.
- Young LS (1990). Aspergillosis. In: Tropical and Geographic Medicine, 2nd ed. (Eds. Warren KS, Mahmoud AAF), pp 933-940. New York: McGraw Hill.
- Yu TS, Yeo SH, Kim HS (2004). A new species of hypomycetes, *Aspergillus coreanus* sp. nov., isolated from traditional Korean nuruk. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 182–187.
- 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.
- Zhou S, Smith DR, Stanosz GR (2001). Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research*, 105:919–926.
- Zietkiewicz E, Rafalski A y Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-18.

VIII. Anexos

VIII. ANEXO

Anexo VIII.1. Identificación morfológica de las cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* analizadas en el presente estudio provenientes de diferentes sustratos y regiones geográficas.

Sustrato	Origen geográfica	Cepa	Clasificación morfológica
Almendra	Almacén Río Cuarto	ANRC 800	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 801	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 802	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 803	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 804	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 805	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 807	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 808	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 809	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 810	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 811	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 813	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 814	Agregado <i>A. niger</i>
	Café	Sur de Córdoba	ANRC 700
Sur de Córdoba		ANRC 701	Agregado <i>A. niger</i>
Sur de Córdoba		ANRC 702	Agregado <i>A. niger</i>
Sur de Córdoba		ANRC 703	Agregado <i>A. niger</i>
Sur de Córdoba		ANRC 704	Agregado <i>A. niger</i>
Desechos de maní	Sur de Córdoba	ANRC 400	Agregado <i>A. niger</i>
	Sur de Córdoba	ANRC 401	Agregado <i>A. niger</i>
	Sur de Córdoba	ANRC 402	Agregado <i>A. niger</i>
Maní	Acequias (Córdoba)	ANRC 407	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 408	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 409	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 411	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 412	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 413	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 414	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 415	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 416	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 417	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 418	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 419	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 420	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 421	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 422	Agregado <i>A. niger</i>

Anexo VIII.1. Continuación

Maní	Molles (Córdoba)	ANRC 423	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 424	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 425	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 427	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 428	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 430	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 431	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 432	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 433	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 434	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 435	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 436	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 437	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 438	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 439	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 440	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 441	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 442	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 443	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 444	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 445	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 446	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 447	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 448	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 449	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 450	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 451	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 452	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 453	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 454	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 455	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 456	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 457	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 458	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 459	Agregado <i>A. niger</i>
	Molles (Córdoba)	ANRC 460	Agregado <i>A. niger</i>
	Sur de Córdoba	ANRC 403	Agregado <i>A. niger</i>
	Sur de Córdoba	ANRC 404	Agregado <i>A. niger</i>
	Sur de Córdoba	ANRC 405	Agregado <i>A. niger</i>
	Acequias (Córdoba.)	ANRC 406	Aspergillus Uniseriado

Anexo VIII.1. Continuación

Maní	Molles (Córdoba)	ANRC 410	Aspergillus Uniseriado
	Molles (Córdoba)	ANRC 426	Aspergillus Uniseriado
	Molles (Córdoba)	ANRC 429	Aspergillus Uniseriado
Pasas de uvas	Desconocido	ANRC 558	<i>A. carbonarius</i>
	Desconocido	ANRC 559	<i>A. carbonarius</i>
	Desconocido	ANRC 560	<i>A. carbonarius</i>
	Desconocido	ANRC 561	<i>A. carbonarius</i>
	Desconocido	ANRC 562	<i>A. carbonarius</i>
	Desconocido	ANRC 564	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 500	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 501	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 503	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 504	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 505	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 506	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 507	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 508	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 509	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 510	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 511	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 512	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 513	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 514	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 515	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 547	<i>A. carbonarius</i>
	San Juan	ANRC 502	<i>A. carbonarius</i>
	Desconocido	ANRC 563	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 516	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 517	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 519	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 520	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 521	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 522	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 518	Agregado <i>A. niger</i>
San Juan	ANRC 523	Agregado <i>A. niger</i>	
San Juan	ANRC 524	Agregado <i>A. niger</i>	
San Juan	ANRC 525	Agregado <i>A. niger</i>	
San Juan	ANRC 526	Agregado <i>A. niger</i>	
San Juan	ANRC 527	Agregado <i>A. niger</i>	
San Juan	ANRC 531	Agregado <i>A. niger</i>	

Anexo VIII.1. Continuación

Pasas de uvas	San Juan	ANRC 532	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 533	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 534	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 535	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 536	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 537	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 538	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 539	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 540	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 541	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 542	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 543	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 544	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 546	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 548	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 550	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 551	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 552	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 553	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 554	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 555	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 556	Agregado <i>A. niger</i>
	San Juan	ANRC 557	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 528	<i>Aspergillus</i> Uniseriado
	San Juan	ANRC 529	<i>Aspergillus</i> Uniseriado
	San Juan	ANRC 530	<i>Aspergillus</i> Uniseriado
	San Juan	ANRC 545	<i>Aspergillus</i> Uniseriado
San Juan	ANRC 549	<i>Aspergillus</i> Uniseriado	
Pimienta	Almacén Río Cuarto	ANRC 900	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 901	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 902	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 903	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 904	Agregado <i>A. niger</i>
	Almacén Río Cuarto	ANRC 905	Agregado <i>A. niger</i>
Residuo de cervecería	Villa Gral. Belgrano	ANRC 202	<i>A. carbonarius</i>
	Villa Gral. Belgrano	ANRC 203	<i>A. carbonarius</i>
	Villa Gral. Belgrano	ANRC 204	<i>A. carbonarius</i>
	Villa Gral. Belgrano	ANRC 200	Agregado <i>A. niger</i>
	Villa Gral. Belgrano	ANRC 201	Agregado <i>A. niger</i>
Soja	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 101	Agregado <i>A. niger</i>

Anexo VIII.1. Continuación

Soja	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 102	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 103	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 104	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 105	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 106	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 107	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 108	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 109	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 110	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 111	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 112	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 113	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 114	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 115	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 116	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 118	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 119	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 120	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 121	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 122	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 123	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 124	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 125	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 127	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 128	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 129	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 100	Agregado <i>A. niger</i>
	Acopio Sur de Córdoba	ANRC 126	Agregado <i>A. niger</i>
Suelo	Chilecito (La Rioja)	ANRC 601	<i>A. carbonarius</i>
	Pocito (San Juan)	ANRC 600	<i>A. carbonarius</i>
	Serrano (Córdoba.)	ANRC 602	Agregado <i>A. niger</i>
	Serrano (Córdoba)	ANRC 603	Agregado <i>A. niger</i>
	Serrano (Córdoba)	ANRC 604	Agregado <i>A. niger</i>
Uvas	Mendoza	ANRC 300	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 301	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 302	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 303	Agregado <i>A. niger</i>
	Mendoza	ANRC 304	Agregado <i>A. niger</i>

³ +0³ +1³ +2³ +3³ +4³ +5³
 ÚAA`
 ³ 0³ 0.930³ 0.930³ 0.930³ 0.930³ 0.930³ 0.930³
 AAAÚ

Synapomorphies common to 6 trees

(Node numbers refer to nodes in consensus)

<i>A. flavus</i> CBS 100927: All trees: No autapomorphies:	ANRC 443: All trees: No autapomorphies:	Char. 57: T --> C Char. 156: C --> T Char. 332: C --> T Char. 344: C --> T
ANRC 417: All trees: No autapomorphies:	ANRC 456: All trees: No autapomorphies:	Char. 394: C --> T Char. 489: C --> T Char. 552: C --> T
ANRC 414: All trees: No autapomorphies:	ANRC 431: All trees: No autapomorphies:	<i>A. welwitschiae</i> ITEM 4509: All trees: No autapomorphies:
ANRC 129: All trees: No autapomorphies:	ANRC 701: All trees: No autapomorphies:	ANRC 412: All trees: No autapomorphies:
ANRC 420: All trees: No autapomorphies:	ANRC 421: All trees: No autapomorphies:	ANRC 415: All trees: No autapomorphies:
ANRC 419: All trees: No autapomorphies:	ANRC 102: All trees: Char. 619: G --> C	ANRC 427: All trees: No autapomorphies:
ANRC 125: All trees: No autapomorphies:	ANRC 106: All trees: No autapomorphies:	ANRC 433: All trees: No autapomorphies:
ANRC 304: All trees: No autapomorphies:	ANRC 119: All trees: No autapomorphies:	ANRC 446: All trees: No autapomorphies:
ANRC 105: All trees: No autapomorphies:	<i>A. aculeatus</i> ITEM 7046: All trees: Char. 17: C --> T	ANRC 447: All trees: No autapomorphies:

ANRC 452: All trees: No autapomorphies:	<i>A. japonicus</i> ITEM 7034: All trees: No autapomorphies:	ANRC 524: All trees: No autapomorphies:
ANRC 458: All trees: No autapomorphies:	<i>A. lacticofeatus</i> CBS 101883: All trees: Char. 54: A --> G Char. 58: T --> A Char. 64: T --> C Char. 66: T --> A	ANRC 700: All trees: No autapomorphies:
<i>A. costaricaenses</i> CBS 115574: All trees: Char. 155: C --> T Char. 202: G --> C Char. 227: T --> C	<i>A. neoniger</i> CBS 115656: All trees: Char. 221: G --> A	ANRC 702: All trees: Char. 138: T --> C Char. 155: C --> T
<i>A. eucalypticola</i> CBS 122712: All trees: Char. 70: A --> T Char. 197: G --> A Char. 314: C --> T Char. 528: T --> C Char. 558: C --> T	<i>A. sclerotioniger</i> CBS 115572: All trees: Char. 64: C --> A Char. 67: T --> A Char. 75: A --> G Char. 109: T --> C Char. 182: C --> T Char. 190: C --> T Char. 191: C --> T Char. 314: C --> T Char. 320: C --> T Char. 405: C --> T Char. 441: T --> C Char. 444: C --> T Char. 465: G --> A Char. 540: C --> T	ANRC 528: All trees: No autapomorphies:
<i>A. fijensis</i> CBS 311.89: All trees: Char. 155: C --> G Char. 170: C --> T Char. 359: C --> T Char. 396: G --> A Char. 477: C --> T		ANRC 529: All trees: No autapomorphies:
<i>A. foetidus</i> NRRL341: All trees: No autapomorphies:		<i>A. floridensis</i> ITEM 14783: All trees: Char. 12: C --> T Char. 34: G --> A Char. 57: T --> A Char. 112: T --> C Char. 344: C --> T Char. 373: G --> C
<i>A. indologenus</i> ITEM 7038: All trees: Char. 332: C --> T Some trees: Char. 232: T --> C Char. 571: C --> T	ANRC 410: All trees: No autapomorphies:	<i>A. trinidadensis</i> ITEM 14821: All trees: Char. 278: T --> C
	ANRC 426: All trees: No autapomorphies:	<i>A. luchuenesis</i> CBS 564.65: All trees: No autapomorphies:

- A. aculeatinus* CBS
121060:
All trees:
Char. 68: G → C
Char. 69: A → T
Char. 70: T → G
Char. 72: C → T
Char. 73: C → A
Char. 163: G → A
Char. 384: C → T
Char. 398: C → T
- A. brasiliensis* IMI 381727:
All trees:
Char. 34: T → A
Char. 350: G → A
Char. 394: G → A
- A. carbonarius* ITEM 4503:
All trees:
No autapomorphies:
- A. ellipticus* ITEM 4505:
All trees:
Char. 14: T → C
Char. 38: C → A
Char. 44: C → G
Char. 51: G → A
Char. 61: C → G
Char. 180: G → A
Char. 184: T → C
Char. 206: C → A
Char. 208: T → A
Char. 260: G → C
Char. 263: C → T
Char. 266: T → C
Char. 392: G → A
Char. 393: C → T
Char. 402: G → T
Char. 404: A → T
Char. 441: T → C
Char. 510: C → T
Char. 564: C → T
- Char. 622: C → T
- A. foetidus* CBS 12.128:
All trees:
No autapomorphies:
- A. heteromorphus* ITEM
7045:
All trees:
Char. 15: C → G
Char. 16: C → T
Char. 50: T → G
Char. 60: G → C
Char. 67: T → G
Char. 109: T → C
Char. 114: T → C
Char. 168: C → T
Char. 222: T → C
Char. 278: C → T
Char. 390: A → G
Char. 407: G → A
Char. 415: A → G
Char. 431: C → T
- A. homomorphus* ITEM
7556:
All trees:
Char. 74: T → G
Char. 170: C → T
Char. 179: C → T
Char. 184: T → G
Char. 187: C → G
Char. 190: C → T
Char. 210: A → C
Char. 215: G → A
Char. 222: T → A
Char. 225: T → A
Char. 229: A → C
Char. 308: C → T
Char. 372: T → C
Char. 398: C → G
Char. 400: C → T
Char. 403: G → A
- Char. 409: G → T
Char. 415: A → G
Char. 453: C → T
Char. 498: T → A
Char. 531: C → T
Char. 555: C → T
Some trees:
Char. 228: T → C
- A. ibericus* ITEM 4776:
All trees:
Char. 40: G → A
- A. niger* ITEM 4501:
All trees:
No autapomorphies:
- A. scleroticarbonarius* CBS
121057:
All trees:
Char. 34: T → C
Char. 46: C → T
Char. 93: C → T
Char. 121: C → G
Char. 260: G → C
Char. 323: C → T
Char. 375: G → C
Char. 441: T → C
Char. 444: C → T
Char. 453: T → C
- A. saccharolyticus* CBS
127449:
All trees:
Char. 123: C → A
Char. 158: C → T
Char. 162: A → T
Char. 163: G → A
Char. 174: G → A
Char. 185: A → G
Char. 186: G → A
Char. 192: A → T
Char. 194: A → C

Char. 197: G --> A	ANRC 500:	ANRC 545:
Char. 199: C --> T	All trees:	All trees:
Char. 208: C --> A	No autapomorphies:	No autapomorphies:
Char. 227: C --> T		
Char. 281: C --> G	ANRC 502:	ANRC 547:
Char. 320: C --> T	All trees:	All trees:
Char. 323: C --> T	No autapomorphies:	No autapomorphies:
Char. 332: C --> T		
Char. 359: C --> T	ANRC 601:	ANRC 548:
Char. 383: C --> T	All trees:	All trees:
Char. 394: A --> G	No autapomorphies:	No autapomorphies:
Char. 396: G --> A		
Char. 407: G --> A	ANRC 514:	ANRC 549:
Char. 424: C --> G	All trees:	All trees:
Char. 444: C --> A	No autapomorphies:	No autapomorphies:
Char. 465: G --> A		
Char. 477: C --> T	ANRC 703:	ANRC 552:
Char. 486: G --> A	All trees:	All trees:
Char. 519: T --> C	No autapomorphies:	Char. 177: A --> G
Char. 558: C --> T		
Some trees:	ANRC 704:	ANRC 554:
Char. 59: G --> A	All trees:	All trees:
	No autapomorphies:	No autapomorphies:
<i>A. tubingensis</i> ITEM 7040:		
All trees:	ANRC 603:	ANRC 555:
No autapomorphies:	All trees:	All trees:
	No autapomorphies:	No autapomorphies:
<i>A. uvarum</i> ITEM 4834:		
All trees:	ANRC 300:	ANRC 556:
Char. 431: C --> T	All trees:	All trees:
	No autapomorphies:	No autapomorphies:
<i>A. vadensis</i> CBS 113365:		
All trees:	ANRC 539:	ANRC 559:
Char. 157: G --> A	All trees:	All trees:
Char. 199: T --> G	No autapomorphies:	No autapomorphies:
Char. 204: A --> T		
Char. 296: C --> T	ANRC 540:	ANRC 563:
	All trees:	All trees:
	No autapomorphies:	Char. 200: C --> T
<i>A. violaceusfuscus</i> CBS 12327:		
All trees:	ANRC 544:	ANRC 801:
No autapomorphies:	All trees:	All trees:
	No autapomorphies:	No autapomorphies:

ANRC 802: All trees: No autapomorphies:	ANRC 100: All trees: No autapomorphies:	ANRC 116: All trees: No autapomorphies:
ANRC 811: All trees: No autapomorphies:	ANRC 101: All trees: No autapomorphies:	<i>A. piperis</i> KACC45133: All trees: No autapomorphies:
ANRC 400: All trees: No autapomorphies:	ANRC 107: All trees: No autapomorphies:	<i>A. piperis</i> KACC45132: All trees: No autapomorphies:
ANRC 401: All trees: No autapomorphies:	ANRC 108: All trees: No autapomorphies:	ANRC 118: All trees: No autapomorphies:
ANRC 403: All trees: No autapomorphies:	ANRC 109: All trees: No autapomorphies:	ANRC 120: All trees: No autapomorphies:
ANRC 404: All trees: No autapomorphies:	ANRC 110: All trees: No autapomorphies:	ANRC 121: All trees: No autapomorphies:
ANRC 516: All trees: No autapomorphies:	ANRC 111: All trees: No autapomorphies:	ANRC 122: All trees: No autapomorphies:
ANRC 517: All trees: No autapomorphies:	ANRC 112: All trees: No autapomorphies:	ANRC 124: All trees: No autapomorphies:
ANRC 519: All trees: Char. 574: C --> T	ANRC 113: All trees: No autapomorphies:	ANRC 126: All trees: No autapomorphies:
ANRC 521: All trees: No autapomorphies:	ANRC 114: All trees: No autapomorphies:	ANRC 127: All trees: No autapomorphies:
ANRC 602: All trees: No autapomorphies:	ANRC 115: All trees: No autapomorphies:	ANRC 128: All trees: No autapomorphies:

ANRC 407: All trees: No autapomorphies:	ANRC 432: All trees: No autapomorphies:	ANRC 902: All trees: Char. 222: T --> C
ANRC 408: All trees: No autapomorphies:	ANRC 434: All trees: No autapomorphies:	ANRC 904: All trees: No autapomorphies:
ANRC 409: All trees: No autapomorphies:	ANRC 436: All trees: No autapomorphies:	ANRC 903: All trees: No autapomorphies:
ANRC 411: All trees: No autapomorphies:	ANRC 441: All trees: No autapomorphies:	ANRC 905: All trees: No autapomorphies:
ANRC 413: All trees: No autapomorphies:	ANRC 444: All trees: No autapomorphies:	ANRC 200: All trees: No autapomorphies:
ANRC 416: All trees: No autapomorphies:	ANRC 445: All trees: No autapomorphies:	Node 144: All trees: Char. 110: T --> C
ANRC 423: All trees: No autapomorphies:	ANRC 450: All trees: No autapomorphies:	Node 145: All trees: Char. 190: C --> T Char. 196: C --> T Char. 197: G --> T Char. 510: C --> T Some trees: Char. 189: T --> C
ANRC 424: All trees: No autapomorphies:	ANRC 453: All trees: No autapomorphies:	
ANRC 428: All trees: No autapomorphies:	ANRC 454: All trees: No autapomorphies:	Node 146: All trees: Char. 17: A --> T Char. 124: G --> A Char. 155: C --> T Char. 203: A --> G Char. 215: G --> A Char. 234: A --> T Char. 281: C --> T Char. 371: A --> T
ANRC 429: All trees: No autapomorphies:	ANRC 900: All trees: No autapomorphies:	
ANRC 430: All trees: No autapomorphies:	ANRC 901: All trees: No autapomorphies:	

- Char. 396: G → A
 Char. 531: C → T
 Some trees:
 Char. 195: GT → A
- Node 147:
 All trees:
 Char. 2: G → A
 Char. 28: AT → C
 Char. 46: C → T
 Char. 141: G → A
 Char. 145: A → C
 Char. 178: A → C
 Char. 199: C → T
 Char. 223: G → A
 Char. 260: G → C
 Char. 347: C → A
 Char. 373: G → A
 Char. 375: G → A
 Char. 385: A → G
 Char. 404: A → G
 Char. 486: G → A
 Char. 525: C → T
 Char. 571: C → T
 Char. 595: G → A
- Node 148:
 All trees:
 Char. 17: G → A
 Char. 19: G → A
 Char. 23: T → A
 Char. 71: G → A
 Char. 105: C → G
 Char. 113: T → AG
 Char. 115: A → C
 Char. 158: C → A
 Char. 168: C → G
 Char. 172: C → T
 Char. 232: T → A
 Char. 384: C → T
 Char. 394: A → G
 Char. 453: C → T
 Char. 589: T → C
- Some trees:
 Char. 189: C → T
- Node 149:
 All trees:
 Char. 11: G → T
 Char. 14: A → T
 Char. 66: C → T
 Char. 100: T → G
 Char. 101: A → G
 Char. 161: T → C
 Char. 162: A → G
 Char. 163: G → A
 Char. 169: A → G
 Char. 187: C → T
 Char. 229: A → G
 Char. 233: G → A
 Char. 258: T → C
 Char. 421: A → T
 Char. 528: C → T
 Some trees:
 Char. 402: A → G
- Node 150:
 All trees:
 No synapomorphies
- Node 151:
 All trees:
 Char. 127: T → A
 Char. 165: C → T
- Node 152:
 All trees:
 Char. 173: T → C
 Char. 191: C → T
 Char. 278: C → T
 Char. 628: C → T
 Some trees:
 Char. 195: G → A
 Char. 228: T → C
 Char. 232: T → C
 Char. 275: T → C
- Char. 329: C → T
- Node 153:
 All trees:
 Char. 23: T → C
 Char. 26: A → T
 Char. 34: T → G
 Char. 35: T → C
 Char. 39: T → G
 Char. 40: G → A
 Char. 44: C → A
 Char. 51: G → A
 Char. 58: T → C
 Char. 65: T → C
 Char. 66: C → G
 Char. 68: T → G
 Char. 75: A → G
 Char. 105: C → T
 Char. 110: T → C
 Char. 114: T → A
 Char. 115: A → C
 Char. 120: T → C
 Char. 121: C → A
 Char. 125: C → A
 Char. 135: A → C
 Char. 137: C → G
 Char. 139: G → C
 Char. 184: T → C
 Char. 187: C → A
 Char. 189: C → A
 Char. 194: A → T
 Char. 199: C → A
 Char. 210: A → T
 Char. 222: T → G
 Char. 223: G → A
 Char. 233: G → T
 Char. 245: C → T
 Char. 392: G → A
 Char. 394: A → C
 Char. 406: T → A
 Char. 407: G → T
 Char. 537: C → T
 Char. 595: G → A

Some trees:

Char. 17: G → C
Char. 567: C → T

Node 154:

All trees:

Char. 41: G → A
Char. 73: T → C
Char. 127: T → A
Char. 138: T → C
Char. 157: G → A
Char. 166: G → A
Char. 174: T → G
Char. 186: T → G
Char. 188: T → A
Char. 193: G → C
Char. 208: T → C
Char. 212: A → T
Char. 228: G → CT
Char. 239: C → A
Char. 242: G → A
Char. 263: C → T
Char. 393: C → T
Char. 397: A → G
Char. 398: A → C
Char. 400: G → C
Char. 422: T → G
Char. 513: C → T

Some trees:

Char. 275: C → T

Node 155:

All trees:

Char. 35: T → C
Char. 121: C → A
Char. 190: C → T
Char. 293: C → T
Char. 399: T → C

Node 156:

All trees:

Char. 0: T → A
Char. 1: G → A

Char. 2: A → T

Char. 4: C → A

Char. 13: A → G

Char. 20: T → A

Char. 25: G → A

Char. 26: A → G

Char. 51: G → A

Char. 54: A → G

Char. 64: T → C

Char. 65: T → C

Char. 68: C → G

Char. 158: A → G

Char. 159: T → A

Char. 168: G → A

Char. 173: T → C

Char. 188: T → C

Char. 266: T → C

Char. 381: G → A

Char. 386: T → G

Char. 492: C → T

Char. 574: C → T

Char. 601: T → C

Char. 622: C → T

Some trees:

Char. 209: A → G

Node 157:

All trees:

Char. 6: T → C
Char. 27: G → C
Char. 59: G → A
Char. 200: T → C
Char. 377: T → C

Node 158:

All trees:

Char. 1: G → A
Char. 34: T → A
Char. 138: T → C
Char. 628: C → T

Node 159:

All trees:

Char. 66: T → C

Char. 121: C → T

Char. 390: A → G

Node 160:

All trees:

Char. 14: T → C
Char. 15: C → T
Char. 21: C → T
Char. 42: A → C
Char. 70: G → A
Char. 192: A → C
Char. 227: C → T
Char. 402: G → C
Char. 404: G → T
Char. 405: C → A
Char. 547: C → T
Char. 586: C → T
Char. 619: G → T

Node 161:

All trees:

Char. 69: G → A
Char. 182: C → T
Char. 194: A → T

Some trees:

Char. 26: A → T
Char. 409: G → A

Node 162:

All trees:

Char. 58: T → G
Char. 65: T → G
Char. 66: T → A
Char. 67: T → C
Char. 69: G → T

Node 163:

All trees:

Char. 441: T → C

Node 164:

All trees:

- Char. 193: C → T
- Node 165:**
All trees:
Char. 192: A → G
Char. 308: C → T
Char. 356: C → T
Char. 394: C → G
Char. 397: G → A
Char. 574: C → T
- Node 166:**
All trees:
Char. 45: A → C
Char. 135: C → A
Char. 179: C → T
Char. 269: T → C
Char. 359: C → T
Char. 388: C → T
Char. 507: C → T
Char. 522: C → T
- Node 167:**
All trees:
Char. 50: T → C
Char. 110: T → C
Char. 179: A → T
Char. 182: C → A
- Node 168:**
All trees:
Char. 110: T → C
Char. 115: C → T
Char. 376: T → C
Char. 531: C → T
Char. 543: G → T
- Node 169:**
All trees:
Char. 0: T → A
Char. 11: T → C
Char. 14: T → G
Char. 16: C → G
- Char. 20: T → G
Char. 26: A → G
Char. 44: C → T
Char. 64: T → C
Char. 69: G → A
Char. 70: G → T
Char. 139: G → A
Char. 159: T → A
Char. 174: T → C
Char. 185: A → G
Char. 225: T → C
Char. 227: C → T
Char. 278: C → G
Char. 371: A → G
Char. 372: T → C
Char. 382: C → T
Char. 383: C → T
Char. 406: T → C
Char. 418: G → A
Char. 552: C → T
Char. 555: C → T
Char. 574: C → T
- Node 170:**
All trees:
Char. 177: A → G
Char. 314: C → T
Char. 546: G → A
Char. 547: C → T
Some trees:
Char. 71: C → T
Char. 160: A → C
Char. 474: C → T
Char. 567: T → A
Char. 571: C → T
- Node 171:**
All trees:
Char. 194: T → C
Char. 201: C → T
- Node 172:**
All trees:
- Char. 202: G → A
Char. 222: G → C
Char. 226: T → C
Char. 228: C → T
Char. 435: A → G
- Node 173:**
All trees:
Char. 124: G → A
Char. 209: A → G
Char. 226: T → A
Char. 296: C → T
Char. 323: C → T
Char. 329: T → C
Char. 332: C → T
Char. 379: A → G
Char. 384: T → C
Char. 386: T → C
Char. 394: G → A
Char. 395: G → A
Char. 403: G → A
Char. 489: C → T
- Node 174:**
All trees:
Char. 12: C → T
Char. 13: A → T
Char. 34: T → C
Char. 104: G → T
Char. 106: A → C
Char. 112: T → C
Char. 123: CT → A
Char. 135: A → G
Char. 138: T → G
Char. 139: G → T
Char. 159: T → C
Char. 173: T → C
Char. 190: C → G
Char. 191: C → A
Char. 192: A → T
Char. 197: G → T
Char. 212: A → G
Char. 223: G → T

Char. 356: C --> T
 Char. 373: G --> C
 Char. 376: T --> C
 Char. 386: T --> C
 Char. 388: C --> A
 Char. 425: T --> G
 Char. 498: T --> G
 Char. 598: C --> T
 Char. 613: T --> C

Some trees:

Char. 474: C --> T

Node 175:

All trees:

Char. 42: A --> T
 Char. 55: A --> T
 Char. 64: T --> A
 Char. 67: T --> C
 Char. 79: T --> C
 Char. 112: T --> C
 Char. 140: T --> G
 Char. 180: G --> A
 Char. 200: T --> A
 Char. 205: T --> A

Char. 230: T --> C
 Char. 293: C --> T
 Char. 384: C --> G
 Char. 401: C --> G
 Char. 404: A --> C
 Some trees:
 Char. 474: C --> T

Node 176:

All trees:

Char. 68: A --> G
 Char. 118: C --> T
 Char. 139: A --> C
 Char. 156: C --> T
 Char. 206: C --> T
 Char. 232: A --> G
 Char. 374: G --> T
 Char. 378: T --> G
 Char. 393: C --> A
 Char. 404: A --> G
 Char. 540: C --> T
 Char. 549: G --> C

Node 177:

All trees:

Char. 51: G --> A
 Char. 381: G --> A
 Char. 388: C --> G
 Char. 407: G --> A
 Char. 564: C --> T

Node 178:

All trees:

Char. 161: C --> T
 Char. 332: C --> T

Node 179:

All trees:

Char. 138: T --> A

Node 180:

All trees:

Char. 6: C --> T
 Char. 10: A --> G
 Char. 155: C --> T

Some trees:

Char. 226: C --> T

Time 0.78 secs.

Note: for consensus calculation, trees will be temporarily collapsed (when min. branch length = 0)

Strict consensus of 6 trees (0 taxa excluded) calculated, as tree 6

Time 0.00 secs.

Log file: C:\Users\Guillermo\Buffer_878.out

Buffer: lines 0 - 1259 saved to C:\Users\Guillermo\Desktop\Buffer_878.out

Time 0.00 secs.

Anexo VIII.3. Validación del análisis de cluster (Figura V.19) mediante comparación de la matriz cofenética con la matriz de similitud usando el programa NTSYS.

MxComp: NTSYSp 2.01e, (C) 1986-1997, Applied Biostatistics Inc.

Date & time: 27/09/2014 09:27:53 p.m.

Input parameters

Read X input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_32cepas.txt.sim

Read Y input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Cofenetic.nts

Mantel statistic will be normalized

1000 random permutations will be performed.

Comments: SIMQUAL:input=C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_32cepas.txt,
coeff=DICE by Cols, += 1.00000, -= 0.00000

type=3, size=32 by 32, nc=none

Comments:

SIMQUAL:input=C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_32cepas.txt, coeff=DICE by
Cols, += 1.00000, -= 0.00000

SAHN:input=C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_32cepas.txt.sim,
method=UPGMA, tie=WARN

COPH:tree=C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_32cepas.txt.fim

type=3, size=32 by 32, nc=none

N = 496

Mean X = 0.3947 SSx = 19.3060

Mean Y = 0.3947 SSy = 18.3088

Tests for association:

Matrix correlation: r = 0.97383 (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: t = 19.9017

Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

Out of 1000 random permutations;

1000 were < Z, 0 were = Z, and 0 > Z

(The observed comparison is not included in these counts.)

The one-tail probability is:

p[random Z >= observed Z] = 0.0020

Anexo VIII.4. Validación del análisis de cluster (Figura V.21) mediante comparación de la matriz cofenética con la matriz de similitud usando el programa NTSYS.

MxComp: NTSYSpc 2.01e, (C) 1986-1997, Applied Biostatistics Inc.

Date & time: 25/09/2014 03:26:10 p.m.

Input parameters

Read X input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_Maní.txt.sim

Read Y input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\CofeneticManí.nts

Mantel statistic will be normalized

1000 random permutations will be performed.

Comments:

SIMQUAL: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_Maní.txt, coeff=DICE by
Cols, += 1.00000, -= 0.00000

type=3, size=73 by 73, nc=none

Comments:

SIMQUAL: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_Maní.txt, coeff=DICE by
Cols, += 1.00000, -= 0.00000

SAHN: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_Maní.txt.sim,
method=UPGMA, tie=FOUND

COPH: tree= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Analisis\Matriz\SSR_Maní.txt.fim

type=3, size=73 by 73, nc=none

N = 2628

Mean X = 8.0013 SSx = 199792320.0381

Mean Y = 8.0013 SSy = 149812294.4786

Tests for association:

Matrix correlation: $r = 0.86593$ (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = 44.1387$

Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$

Out of 1000 random permutations:

1000 were < Z, 0 were = Z, and 0 > Z

(The observed comparison is not included in these counts.)

The one-tail probability is;

$p[\text{random } Z \geq \text{observed } Z] = 0.0020$

Anexo VIII.5. Validación del análisis de cluster (Figura V.23) mediante comparación de la matriz cofenética con la matriz de similitud usando el programa NTSYS.

MxComp: NTSYSpc 2.01e, (C) 1986-1997, Applied Biostatistics Inc.

Date & time: 25/09/2014 03:28:06 p.m.

Input parameters

Read X input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Soja.txt.sim

Read Y input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Cofenetic_Soja.nts

Mantel statistic will be normalized

1000 random permutations will be performed.

Comments:

SIMQUAL: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Soja.txt, coeff=DICE by

Cols, += 1.00000, -= 0.00000

type=3, size=37 by 37, nc=none

Comments:

SIMQUAL: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Soja.txt, coeff=DICE by
Cols, += 1.00000, -= 0.00000

SAHN: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Soja.txt.sim,
method=UPGMA, tie=WARN

COPH: tree= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Soja.txt.fim

type=3, size=37 by 37, nc=none

N = 666

Mean X = 0.4976 SSx = 46.9551

Mean Y = 0.4976 SSy = 44.0284

Tests for association:

Matrix correlation: r = 0.96833 (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: t = 8.9237

Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

Out of 1000 random permutations:

1000 were < Z, 0 were = Z, and 0 > Z

(The observed comparison is not included in these counts.)

The one-tail probability is:

p[random Z >= observed Z] = 0.0020

Anexo VIII.6. Validación del análisis de cluster (Figura V.25) mediante comparación de la matriz cofenética con la matriz de similitud usando el programa NTSYS.

MxComp: NTSYSpc 2.01e, (C) 1986-1997, Applied Biostatistics Inc.

Date & time: 26/09/2014 09:03:47 a.m.

Input parameters

Read X input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Pasas.txt.sim

Read Y input from file: C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Cofenetic_Pasas.nts

Mantel statistic will be normalized

1000 random permutations will be performed.

Comments:

SIMQUAL: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Pasas.txt, coeff=DICE by

Cols, += 1.00000, -= 0.00000

type=3, size=72 by 72, nc=none

Comments:

SIMQUAL: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Pasas.txt, coeff=DICE by

Cols, += 1.00000, -= 0.00000

SAHN: input= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Pasas.txt.sim,

method=UPGMA, tie=WARN

COPH: tree= C:\Users\Public\Documents\ISSRMarker\Análisis\Matriz\SSR_Pasas.txt.fim

type=3, size=72 by 72, nc=none

N = 2556

Mean X = 0.4375 SSx = 119.6516

Mean Y = 0.4375 SSy = 103.6791

Tests for association:

Matrix correlation: $r = 0.93086$ (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = 32.9768$

Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$

Out of 1000 random permutations:

1000 were < Z, 0 were = Z, and 0 > Z

(The observed comparison is not included in these counts.)

The one-tail probability is:

$p[\text{random } Z \geq \text{observed } Z] = 0.0020$

Anexo VIII.7a. Resumen del estudio polifásico de 61 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de maní.

Clasificación morfológica	Región geográfica	Identificación molecular			Micotoxinas	
		Cebadores específicos	ISSR	Calmodulina	OTA	FB2
<i>Aspergillus uniseriados</i>						
ANRC 406	Las Acequias (Cba.)	JAPO1/2	<i>A. japonicus</i>		nd	ND
ANRC 426	Molles (Cba)	JAPO1/2	<i>A. uvarum</i>	<i>A. uvarum</i>	nd	ND
ANRC 429	Molles (Cba)	JAPO1/2	<i>A. uvarum</i>	<i>A. uvarum</i>	nd	ND
ANRC 410	Molles (Cba)	JAPO1/2	<i>A. uvarum</i>	<i>A. uvarum</i>	nd	ND
<i>Agregado A. niger</i>						
ANRC 415	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 408	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 416	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 427	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 433	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 434	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 444	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 445	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 446	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 447	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 450	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 411	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 412	Molles (Cba)	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	nd	ND
ANRC 400	Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 401	Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 403	Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 404	Sur de Córdoba	NIG1/2		<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 417	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 418	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>		nd	nd

Anexo VIII.7a. Continuación.

ANRC 419	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 420	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 421	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 423	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 424	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 407	Las Acequias (Cba.)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	+
ANRC 428	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 430	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 431	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 432	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 436	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 441	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 443	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 409	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 453	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 454	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 456	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 458	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 413	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 414	Molles (Cba)	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 402	Sur de Córdoba	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 405	Sur de Córdoba	TUB1/2			nd	nd
ANRC 422	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 425	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 435	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 437	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 438	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 439	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND

Anexo VIII.7a. Continuación.

ANRC 440	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 442	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 448	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 449	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 451	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 452	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	nd	ND
ANRC 455	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 457	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 459	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 460	Molles (Cba)	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND

ND: no determinado; nd: no detectable;+: niveles de toxina cuantificables; JAPO1/JAPO2, TUB1/TUB2, NIG1/2: amplificación específica con los cebadores correspondientes; Negativo NIG1/2; TUB1/2: sin amplificación con los cebadores correspondientes.

Anexo VIII.7b. Resumen del estudio polifásico de 65 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de pasas de uvas.

Clasificación morfológica	Región geográfica	Identificación molecular			Micotoxinas	
		Cebadores específicos	ISSR	Calmodulina	OTA	FB2
<i>Aspergillus uniseriados</i>						
ANRC 528	Mendoza	JAPO1/2	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	nd	ND
ANRC 529	San Juan	JAPO1/2	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	nd	ND
ANRC 530	San Juan	JAPO1/2	<i>A. japonicus</i>		nd	ND
ANRC 545	San Juan	JAPO1/2	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	nd	ND
ANRC 549	San Juan	JAPO1/2	<i>A. japonicus</i>	<i>A. japonicus</i>	nd	ND
Agregado <i>A. niger</i>						
ANRC 539	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 540	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 544	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 548	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 553	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>		nd	ND
ANRC 554	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 555	San Juan	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 516	Mendoza	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	ND
ANRC 517	Mendoza	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 519	Mendoza	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 521	Mendoza	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 524	San Juan	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	+
ANRC 552	San Juan	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 556	San Juan	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 518	San Juan	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND
ANRC 520	Mendoza	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND

Anexo VIII.7b. Continuación.

ANRC 522	Mendoza	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 523	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 525	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 526	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 527	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>	<i>A. tuingensis</i>	nd	ND
ANRC 563	Desconocido	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>	<i>A. tuingensis</i>	nd	ND
ANRC 531	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 532	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 533	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 534	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 535	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 536	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 537	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 538	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 541	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 542	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 543	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 546	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 550	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 551	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
ANRC 557	San Juan	TUB1/2	<i>A. tuingensis</i>		nd	ND
Serie Carbonaria						
ANRC 501	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 502	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	+	ND
ANRC 503	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 504	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND

Anexo VIII.7b. Continuación.

ANRC 505	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 506	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 507	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 508	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 509	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 510	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 511	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 512	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 513	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 514	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	+	ND
ANRC 515	San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 558	Desconocido	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 559	Desconocido	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	nd	ND
ANRC 560	Desconocido	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 561	Desconocido	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 562	Desconocido	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 564	Desconocido	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 500	San Juan	Negativo CARBO1/2	<i>A. ibericus</i>	<i>A. ibericus</i>	nd	ND
ANRC 547	San Juan	Negativo CARBO1/2	<i>A. ibericus</i>	<i>A. ibericus</i>	nd	ND

ND: no determinado; nd: no detectable;+: niveles de toxina cuantificables; JAPO1/JAPO2, TUB1/TUB2, NIG1/2: amplificación específica con los cebadores correspondientes; Negativo NIG1/2; TUB1/2: sin amplificación con los cebadores correspondientes.

Anexo VIII.7c. Resumen del estudio polifásico de 29 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de soja.

Clasificación morfológica	Región geográfica	Identificación molecular			Micotoxinas	
		Cebadores específicos	ISSR	Calmodulina	OTA	FB2
Agregado <i>A. niger</i>						
ANRC 100	Acopio Sur de Córdoba	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 108	Acopio Sur de Córdoba	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	ND
ANRC 110	Acopio Sur de Córdoba	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	nd
ANRC 118	Acopio Sur de Córdoba	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	nd
ANRC 109	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 111	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 112	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 113	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 114	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 115	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 116	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 101	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 119	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 120	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 121	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 122	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 124	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 125	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 126	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 102	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 127	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 128	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd

Anexo VIII.7c. Continuación.

ANRC 129	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 103	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>		nd	nd
ANRC 104	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>		+	+
ANRC 105	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 106	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 107	Acopio Sur de Córdoba	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 123	Acopio Sur de Córdoba	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	ND

ND: no determinado; nd: no detectable;+: niveles de toxina cuantificables; JAPO1/JAPO2, TUB1/TUB2, NIG1/2: amplificación específica con los cebadores correspondientes; Negativo NIG1/2; TUB1/2: sin amplificación con los cebadores correspondientes.

Anexo VIII.7d. Resumen del estudio polifásico de 39 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de suelo, uvas, pimienta, residuos de cervecería, almendra y café.

Clasificación morfológica	Región geográfica y sustrato	Identificación molecular			Micotoxinas	
		Cebadores específicos	ISSR	Calmodulina	OTA	FB2
Agregado <i>A. niger</i>						
ANRC 604	Serrano (Cba.), Suelo	NIG1/2			nd	nd
ANRC 603	Serrano (Cba.), Suelo	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 602	Serrano (Cba.), Suelo	NIG1/2		<i>A. welwitschiae</i>	nd	+
ANRC 300	Mendoza, Uvas	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 304	Mendoza, Uvas	NIG1/2		<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 301	Mendoza, Uvas	TUB1/2	<i>A. tubingensis</i>		nd	nd
ANRC 302	Mendoza, Uvas	TUB1/2			nd	nd
ANRC 303	Mendoza, Uvas	TUB1/2			nd	nd
ANRC 900	Almacén (Río Cuarto), Pimienta	NIG1/2		<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 901	Almacén (Río Cuarto), Pimienta	NIG1/2		<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 902	Almacén (Río Cuarto), Pimienta	NIG1/2		<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 903	Almacén (Río Cuarto), Pimienta	NIG1/2		<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 904	Almacén (Río Cuarto), Pimienta	NIG1/2		<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 905	Almacén (Río Cuarto), Pimienta	NIG1/2		<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 201	Villa Gral. Belgrano, Residuos de cervecería	NIG1/2			nd	nd
ANRC 200	Villa Gral. Belgrano, Residuos de cervecería	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 801	Almacén (Río Cuarto), Almendra	NIG1/2		<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 811	Almacén (Río Cuarto), Almendra	NIG1/2		<i>A. welwitschiae</i>	nd	nd
ANRC 800	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 802	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND

Anexo VIII.7d. Continuación

ANRC 803	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 804	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 805	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 807	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 808	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 809	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 810	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 813	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 814	Almacén (Río Cuarto), Almendra	TUB1/2			nd	ND
ANRC 700	Sur de Córdoba, Café comercial	Negativo NIG1/2; TUB1/2	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	nd
ANRC 702	Sur de Córdoba, Café comercial	Negativo NIG1/2; TUB1/3		<i>A. neoniger</i>	nd	nd
ANRC 703	Sur de Córdoba, Café comercial	Negativo NIG1/2; TUB1/4	<i>A. luchuensis</i>	<i>A. luchuensis</i>	nd	nd
ANRC 704	Sur de Córdoba, Café comercial	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
ANRC 701	Sur de Córdoba, Café comercial	NIG1/2	<i>A. niger/A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	nd	nd
<i>A. carbonarius</i>						
ANRC 601	Chilecito (La Rioja), Suelo	CARBO1/2		<i>A. carbonarius</i>	+	ND
ANRC 600	Pocito, San Juan	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 202	Villa Gral. Belgrano, Residuos de cervecería	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND
ANRC 203	Villa Gral. Belgrano, Residuos de cervecería	CARBO1/2			+	ND
ANRC 204	Villa Gral. Belgrano, Residuos de cervecería	CARBO1/2	<i>A. carbonarius</i>		+	ND

ND: no determinado; nd: no detectable;+: niveles de toxina cuantificables; JAPO1/JAPO2, TUB1/TUB2, NIG1/2: amplificación específica con los cebadores correspondientes; Negativo NIG1/2; TUB1/2: sin amplificación con los cebadores correspondientes.

18978

18