

POBLACIONES DE *Aspergillus* EN SEMILLAS DE MAÍZ Y SOJA DE IMPORTACION ARGENTINA: ENFASIS EN LA SECCION FLAVI

(*Aspergillus* population in maize and soja seed imported from Argentina: Emphasis on section Flavi)

*Constanza Sepúlveda O. & **Eduardo Piontelli L

*Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Instituto de Biología, Avenida Brasil 2950, Valparaíso, Chile.

**Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina, Cátedra de Micología, Casilla 92 V, Valparaíso Chile.

Palabras clave: *Aspergillus*, sección Flavi soja, maíz, Argentina

Key words: *Aspergillus*, section Flavi, soja, maize, Argentine

RESUMEN

Durante un período de 5 meses se realizaron muestreos seriados en granos de maíz y soja de procedencia Argentina para estudiar la presencia de especies del género *Aspergillus* (en especial los de la sección Flavi). Para ambos tipos de granos se tomaron 10 muestras mensuales obtenidas de un puerto terrestre (Los Andes, Chile), desde submuestras transportadas en bolsas plásticas y proporcionadas por personal de control sanitario. Los granos se sembraron por duplicado en placas de Petri, utilizando 2 medios: agar malta sal (AMS) y agar agua sal (AAS). Todos los *Aspergillus*, fueron transferidos posteriormente en agar malta (AM) y agar czapek con extracto de levadura (CYA), para su determinación morfológica final, análisis poblacional, frecuencia de presencia en el tiempo y la posible producción de aflatoxinas (sección Flavi) en medio de cultivo específico. En maíz y soja y en ambos medios, se detectó un total de 1669 colonias del género *Aspergillus* (1193 en AMS y 476 en AAS), representando 18 taxa, (17 en maíz y 15 en soja), éstos fueron en orden decreciente: *Aspergillus flavus*, *Eurotium amstelodami*, *E. rubrum*, *A. ellipticus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, *A. tamaritii*, *A. clavatus*, *A. ostianus*, *A. sydowii*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. wentii* y *A. sclerotiorum*. Los 5 primeros taxa representaron el 85,7% de la presencia total. En general en maíz y soja la especie dominante fue *A. flavus*, mientras *E. amstelodami* y *E. rubrum* fueron más frecuentes en soja. Los valores más altos de presencia en maíz fueron en julio y en soja en noviembre. *A. flavus* presentó alta dominancia en ambos granos, seguida con baja frecuencia

de *A. tamaritii* y *A. parasiticus*. Para un análisis morfológico poblacional se seleccionaron al azar 50 cepas de *A. flavus* de todos los subtratos y muestras. En AM y CYA, se observaron cabezas radiadas a columnares laxas mayoritariamente, aproximadamente la mitad de las cepas presentaron cabezas biseriadas y los conidios de 7 y 14 días (medidos con un procesador de imágenes), no tuvieron mayores variaciones en sus diámetros, pero levemente en sus rugosidades. El 86% de las cepas formaron esclerocios, siendo todos de tipo L. Mediante visualización de un halo azul fluorescente bajo luz UV en agar coco, un 44% de las cepas de *A. flavus*, produjeron aflatoxinas. Las cepas de *A. parasiticus* fueron negativas. A pesar que no se consideraron otras comunidades productoras de micotoxinas presentes en estos granos, la alta ocurrencia de *F. verticillioides* en maíz, debe considerarse por sus efectos nocivos en la dieta animal y en salud pública.

ABSTRACT

Serial sampling of maize and soja grains imported from Argentina were carried out for five months in order to study the occurrence of *Aspergillus* species (mainly those of Flavi section). For both kind of grains, ten monthly samples collected from a terrestrial port (Los Andes, Chile) were taken from subsamples transferred in plastic bags and supplied by sanitary control personnel. Grains were cultured in duplicate on Petri dishes by using two media: malt salt agar (AMS) and salt water agar (AAS). All *Aspergillus* detected were lately transferred in malt agar (AM) and czapek agar added with yeast extract (CYA) to determine its ultimate morphological character,

population analysis, frequency of occurrence in time and possible production of aflatoxins in **Flavi** section in a particular medium of culture. In maize and soja and in both media, 1669 colonies of the genus *Aspergillus* (1193 in AMS and 476 in AAS) was detected, representing 18 taxa, (17 in maize and 15 in soja), which in decreasing order were: *Aspergillus flavus*, *Eurotium amstelodami*, *E. rubrum*, *A. ellipticus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, *A. tamaritii*, *A. clavatus*, *A. ostianus*, *A. sydowii*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. wentii* and *A. sclerotium*. The first five taxa represented 85.7% of the overall total. In general, the dominant species was *A. flavus* in maize and soja, whereas *E. amstelodami* and *E. rubrum* were most frequent in soja. Highest values of occurrence in maize were in July and in November, in soja. *A. flavus* exhibited high dominance in both grains followed by a low frequency of *A. tamaritii* and *A. parasiticus*. Fifty strains of *A. flavus* were randomly selected from every substrate and sample in order to carry out a population analysis. In AM and CYA, radiated heads to columnar laxa were mostly observed, about half strains exhibited biserial heads whereas 7-14 day conidia (measured with an image processer) did not reveal any further change in diameter yet they showed some changes in rugosity. Eighty six per cent of strains formed sclerotia, all of type L. By means of the visualization of a fluorescent blue halo under an UV light in coconut agar, 44% of *A. flavus* strains produced aflatoxins. Strains of *A. parasiticus* were negative. Although other communities producing mycotoxins which are present in these grains were not considered, the high occurrence of *F. verticillioides* in maize samples should be studied because of its harmful effects in animal diet and in public health.

INTRODUCCION

Las semillas de maíz y soja ya sea en el campo como en almacenaje, poseen una microbiota particular asociada a bacterias, hongos e insectos que pueden producir daños al mismo grano como o la planta. El ataque fúngico puede empezar en los tejidos sanos o dañados por agentes biológicos o factores ambientales (Wicklow, 1995; Woloshuk *et al.*, 1997). En los campos de cultivos, estas semillas están en contacto directo con comunidades de hongos presentes en el suelo o la vegetación circundante, tales como varios integrantes de los géneros: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* etc., pero en especial por especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, que bajo condiciones ambientales apropiadas (temperatura y humedad) y su gran capacidad xerofílica (a_w bajo 0,90), pueden ser los primeros colonizadores del grano en el

almacenaje, causando biodeterioro (Moss, 1991; Wicklow, 1995; Horn & Dorner, 1998; Samson *et al.*, 2000). Dentro de las actividades biológicas de importancia en el almacenamiento, se destaca la producción de micotoxinas, estimándose que cada año, el 25 % de las cosechas mundiales se ven afectadas por la colonización fúngica (Osweiler, 1992; Devegowda *et al.*, 1998).

El maíz es uno de los sustratos más comunes en la presencia de micotoxinas, especialmente cuando se cultiva en zonas tropicales o cálidas, donde los integrantes del género *Aspergillus* y *Fusarium* encuentran las condiciones de temperatura y humedad óptimas para su desarrollo (Picco & Piontelli, 2005).

El género *Aspergillus*, es de gran relevancia en la producción de estos metabolitos, en especial algunas especies de la sección **Flavi** (*A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*) que producen aflatoxinas B1, B2, G1, G2, con potenciales mutagénicos y carcinogénicos en humanos y animales (Kurtzman *et al.*, 1987; Klich & Pitt, 1988). Sin embargo, dentro de la sección, *A. tamaritii*, *A. oryzae* y *A. sojae* no producen aflatoxinas debido a la variabilidad genética en sus poblaciones (Bayman & Cotty, 1993; Cotty *et al.*, 1994; Wicklow, 1995; Horn & Dorner, 1998). Entre otros colonizadores de los granos de maíz en las zonas cálidas y húmedas, *F. verticillioides*, es un conocido fitopatógeno capaz de producir fusarinas y fumonisinas (B1 y otras) con similares capacidades mutagénicas y carcinogénicas que las aflatoxinas (González *et al.*, 1997; Horn & Dorner, 1998).

La presencia de micotoxinas en los alimentos, conlleva a riesgos agudos o crónicos en salud pública, con repercusiones nacionales e internacionales en el ámbito del control sanitario y por consiguiente en la comercialización de éstos granos (Van Egmond, 1989).

Las especies de *Aspergillus* de la sección **Flavi**, se han estudiado en maíz en muchas partes del mundo (Wicklow, 1991; Zumo & Scott, 1990; Weidenböner *et al.*, 1996). Argentina, aporta abundante información al respecto, especialmente en la provincia de Santa Fe, que produce casi el 30% de la cosecha nacional (Farnochi *et al.*, 1988; Nepote *et al.*, 1988, 1994, 1997; Resnik, 1988a, 1988b; Chulze *et al.*, 1989; Resnik *et al.*, 1996; Etcheverry *et al.*, 1999; Picco *et al.*, 1999; Nesci & Etcheverry, 2002), pero también cultiva otros productos agrícolas, como maní, sorgo, algodón, trigo, etc., en climas considerados cálidos, húmedos y propicios para el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas (Varsavsky *et al.*, 1985; Dalcerro *et al.*, 1997; Magnoli *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2003; Pildain *et al.*, 2004).

Los objetivos principales de esta investigación fueron: determinar y caracterizar morfológicamente en tres períodos estacionales, las poblaciones del género *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación, comparar las posibles variaciones morfofisiológicas en

cultivo de los integrantes de la sección **Flavi** y su producción de aflatoxinas en un medio indicador.

MATERIALES Y METODOS

a) **Obtención de la muestra.** Todas las muestras de semillas de maíz y soja fueron de procedencia argentina, las cuales llegaron a granel al puerto terrestre en Los Andes, Chile, donde las autoridades sanitarias controlan la posible entrada de malezas e insectos mediante muestreos seriados que se transportan a los laboratorios de análisis para su posterior procesamiento hasta su incineración en el tiempo. De las muestras iniciales, se obtuvieron submuestras aleatorias de aproximadamente unos 250 g de ambos granos, los cuales se trasladaron al laboratorio en bolsas plásticas estériles para el análisis de la presencia fúngica. Se obtuvieron muestras de 5 meses distintos, representando 3 estaciones (julio y agosto del 2004 (invierno), septiembre y noviembre del 2004 (inicio y término de primavera) y enero del 2005 (verano). Se procesaron en cada uno de los meses citados 10 muestras de maíz y 10 de soja. Con un total de 50 muestras de cada tipo de grano. A pesar que todas las muestras tenían una rotulación numérica de acceso interno, no fue posible obtener datos de la región de procedencia de estos granos.

b) Métodos del cultivo y siembra de los granos Medios de cultivos utilizados.

1.- Agar malta sal (AMS). Con un contenido de NaCl de 50 g/L La sal se agrega con varios fines: Evitar la germinación de los granos, aumentar la presión osmótica al bajar la actividad de agua (a_w) en el cultivo y facilitar el crecimiento de hongos xerofílicos, en especial las especies de *Aspergillus* que son el objetivo de nuestro estudio. Este medio, debido a sus nutrientes solubles, estimula el desarrollo de muchos hongos, en especial los de crecimiento rápido. Además se agregaron 0,0025 mg/L de Diclorán, para reducir el tamaño de todas las colonias fúngicas asociadas, en especial los **Mucorales**.

2.- Agar agua sal (AAS). Con un contenido de NaCl de 50 g/L y 0,0025 mg/L de Diclorán. Este medio solo representa una cámara húmeda y el único sustrato presente es el maíz o la soja, donde el crecimiento fúngico se aprecia directamente sobre los granos dispuestos en la superficie del agar o alrededor de ellos. Todos los hongos reducen su tiempo de crecimiento y tamaño de las colonias frente a un sustrato no soluble.

Ambos medios no tuvieron un fin netamente comparativo, sino más bien, se emplearon para obtener la mayor diversidad de integrantes del género *Aspergillus*, bajo las diferentes condiciones de los sustratos.

Técnica de siembra de los granos

Diez granos de cada muestra (maíz y soja) tomados al azar desde varias profundidades de las bolsas, con pinza plana esterilizada a la llama sucesivamente, se sembraron por duplicado directamente sobre la superficie del agar en placas de Petri de 10 cm de diámetro de la siguiente forma:

Se colocaron 8 granos sobre la superficie de ambos medios, cerca del borde interno de la placa a una distancia de 1 cm aproximadamente entre ellos y los restantes (2) se colocaron en el centro de la placa.

Las placas se incubaron a 27°C por 10-20 días. Los *Aspergillus* detectados creciendo sobre los granos o en el agar subyacente a estos, fueron contabilizados para determinar su frecuencia relativa, determinándose las especies en un primer intento presuntivo *in situ* ya sea por sus características macro y/o microscópicas, con preparaciones en lactofenol con azul de algodón.

La Frecuencia de aislamientos de cada especie de *Aspergillus* en cada uno de los medios en duplicado, fue calculada de acuerdo al total de colonias detectadas en cada grano, en todas las muestras de los meses analizados.

En cada muestra y en cada medio de cultivo y sus duplicados, se sumaron las presencias de los *Aspergillus* spp. en los 20 granos por muestra, calculándose como valor final el promedio (0 a 10) de la presencia en ambas placas. Cuando las sumas de los duplicados arrojaron números impares, el promedio se aproximó al número entero superior.

Posteriormente, para aislar las cepas al estado puro, se sembró al azar un representante de cada especie de *Aspergillus* en tubos de agar AM inclinado en cada una de las muestras mensuales, las que se incubaron por 7 días a 27°C. Estas cepas se guardaron para la posterior identificación en medios especiales.

c) Determinación de las especies de *Aspergillus* en medios especiales

Desde los aislamientos al estado puro y mediante arrastre con asa estéril sobre la superficie de las colonias, se preparó una abundante suspensión de conidios en 2cc de agua destilada estéril, para posteriormente sembrarse nuevamente en placas de Petri de 10 cm, en AM y CYA. La siembra de cada cepa de *Aspergillus*, se realizó desde la suspensión con una micropipeta colocando tres gotas de 0,07 μ l en 3 puntos centrales en la superficie del agar de cada medio, simulando un triángulo, para obtener 3 colonias equidistantes. Se incubaron las placas por 14-20 días o más a 25°C, para apreciar la presencia de todos los elementos morfológicos específicos y tardíos como esclerocios y cleistotecios.

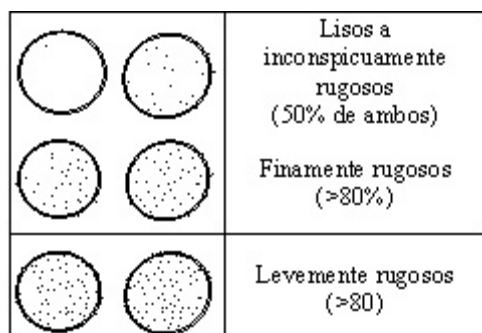


Figura 1. Tipos de rugosidades de las paredes de los conidios de cepas de *A. flavus* en AM, a los 7 y 14 días.

A los 7 días, se analizaron las colonias en AM y CYA midiéndose sus diámetros (en mm), además se observaron los colores del anverso y reverso de las colonias, la presencia de pigmentos solubles; el aspecto de la colonia bajo lupa, tales como tipos de cabezas conidiales, presencia o ausencia del exudado y color.

Con microscopía óptica en AM y aumento de 1000x, se observaron y midieron las rugosidades, colores y formas de los conidióforos, vesículas, métulas filiales y conidios.

d) *Aspergillus* de la sección Flavi.

Los integrantes de esta sección fueron identificados de la misma manera que en el punto c. En más de la mitad de las cepas obtenidas de *A. flavus*, 50 se seleccionaron al azar (28 de maíz y 22 de soja) para efectuar mediciones finas de sus conidios en su eje mayor a los 7 y 14 días en AM, mediante un procesador de imágenes KS-100 conectado a una cámara Canon digital y a un microscopio Zeiss. En las mediciones se consideraron sólo 2 decimales. Para diferenciar el tipo de rugosidad observado en los diferentes tiempos de cultivo, se establecieron 3 categorías, indicadas en la Figura 1. Considerando al mismo tiempo las principales características macro y microscópicas para apreciar posibles variaciones intraespecíficas. La presencia y medida de esclerocios y/o cleistotecios se efectuó entre los 14 y 20 días.

Las monografías utilizadas para la descripción de los *Aspergillus* fueron: Raper y Fennell (1965), Al-Musallam (1980), Klich & Pitt (1988), Kozakiewicz (1989) y Klich (2002a).

e) Análisis Estadístico

Para la comparación de la distribución de las diferentes especies de *Aspergillus* contabilizadas en maíz y soja, se utilizó el índice de distribución de Shannon (H') en cada mes de estudio.

f) Presencia de Aflatoxinas

Para determinar la presencia de aflatoxinas en las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus*, se utilizó el medio rápido de detección Agar Coco (AC). En éste se sembraron las cepas por 5 días a 25°C, para ser observadas bajo luz Ultra Violeta (UV a 365 nm), la cual en presencia de la toxina presenta un halo fluorescente azul alrededor de la colonia (Davis *et al.*, 1987).

RESULTADOS

a) Presencia y distribución de las especies de *Aspergillus* en maíz y soja,

En los granos de maíz y soja se detectó la presencia de un total de 1669 colonias de *Aspergillus* en ambos medios (AMS y AAS), que representaron 18 taxa: *Aspergillus candidus*, *A. clavatus*, *A. ellipticus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. parasiticus*, *A. sclerotiorum*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Eurotium amstelodami* y *E. rubrum* (Tabla 1, Figura 2. D, E, F, G, H). La mayoría de los aislamientos (70%), correspondieron al subgénero **Circumdati** de *Aspergillus* y a 5 de sus secciones: **Candidi** (5,63%), **Circumdati** (4,01%), **Flavi** (45,90%), **Nigri** (14,14%) y **Wentii** (0,12%), siguiendo en importancia el subgénero *Aspergillus* con un 23,01%. El resto incluyó el subgénero **Nidulantes** (6,59%), **Clavati** (0,36%) y **Fumigati** (0,24%).

De los 18 taxa, los más importantes para ambos granos y que representaron el 85,7% del total de presencia, destacaron: *A. flavus* (n=752), *E. amstelodami* (n=185), *E. rubrum* (n=163), *A. ellipticus* (n=137), *A. niger* (n=99) y *A. candidus* (n=94) (Tabla 1). Estos tuvieron un comportamiento distinto en ambos granos en los 5 meses de estudio, a excepción de *A. ellipticus* y *A. candidus* (Figura 2. A, B, C, D, E, F).

En maíz, *A. flavus* tuvo su pick más alto en julio, mientras en agosto, septiembre y noviembre, el número de cepas encontradas fue similar, bajando solo en enero. En soja, la curva es ascendente encontrándose el pick más alto en noviembre (Tabla 1, Figura 2. A).

E. amstelodami y *E. rubrum* se detectaron con mayor frecuencia en soja (Tabla 1) y *E. amstelodami* tuvo sus mayores pick en julio y noviembre, mientras que en maíz, la mayor frecuencia se presentó en agosto (Tabla 1, Figura 2 B). *E. rubrum* se detectó fuertemente en agosto para la soja, mientras que en maíz lo hizo en julio y especialmente en enero (Tabla 1, Figura 2 C).

A. ellipticus, presentó una curva de comportamiento similar para ambos granos en los meses de estudio, encontrándose 2 pick, en agosto y noviembre (Tabla 1, Figura 2 D).

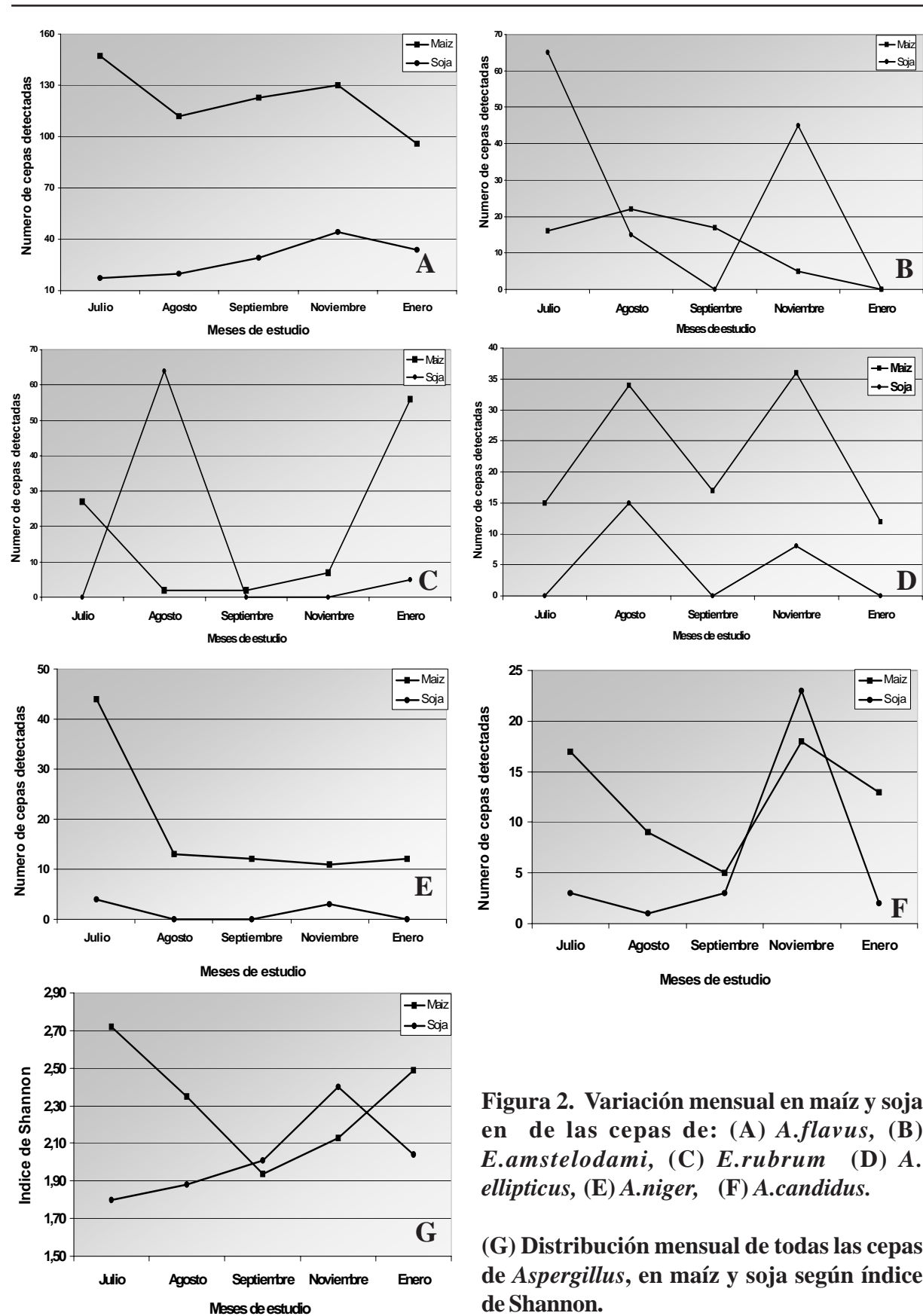


Figura 2. Variación mensual en maíz y soja en de las cepas de: (A) *A. flavus*, (B) *E. amstelodami*, (C) *E. rubrum* (D) *A. ellipticus*, (E) *A. niger*, (F) *A. candidus*.

(G) Distribución mensual de todas las cepas de *Aspergillus*, en maíz y soja según índice de Shannon.

A. niger tuvo su mayor pick en julio, en el resto de los meses la cantidad de cepas encontradas fue similar entre sí; en soja solo se encontraron unos pocos aislamientos en julio y noviembre (Tabla 1, Figura 2 E).

A. candidus tuvo un comportamiento bastante similar en ambos granos, las mayores diferencias se encontraron en julio y enero (Tabla 1, Figura 2 F).

El análisis de la distribución mensual de las especies de *Aspergillus* (Según Shannon), presenta diferencias para los dos granos (Tabla 1, Fig. 2 .G). En maíz, el valor más alto se encontró en julio ($H' = 2,72$) y en septiembre el más bajo ($H' = 1,94$). Por su parte, la soja presentó el valor más alto en noviembre ($H' = 2,4$), y el más bajo en julio ($H' = 1,8$) (Tabla 1, Figura 2. G).

b) Maíz

Se detectó la presencia de un total de 1193 colonias de *Aspergillus* en ambos medios, 695 en AMS y 498 en AAS, representando 17 taxa: *A. candidus*, *A. clavatus**, *A. ellipticus**, *A. flavus**, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus**, *A. parasiticus**, *A. sclerotiorum**, *A. sydowii*, *A. tamaritii**, *A. terreus**, *A. versicolor**, *A. wentii*, *E. amstelodami** y *E. rubrum** (Tabla. 1)(* En Figuras 6-7).

En AMS las 5 especies con mayor frecuencia fueron: *A. flavus* (51,21%), *A. ellipticus* (9,20%), *A. niger* (8,20%), *E. amstelodami* (6,91%) y *E. rubrum* (5,61%), mientras que en AAS, las 5 especies de mayor frecuencia fueron: *A. flavus* (50,60%), *E. rubrum* (11,04%), *A. ellipticus* (10,04%), *A. niger* (7,03%) y *A. candidus* (5,62%) (Tabla 1).

En julio y en ambos medio se observó el mayor número de presencia de especies de *Aspergillus* (n=331) y los 4 meses restante tuvieron presencias inferiores, pero similares entre sí (Tabla 1, Figura 3).

En todos los meses de estudio, el taxa dominante en ambos medios fue *A. flavus*, siendo siempre mayor en AMS (Tabla 1).

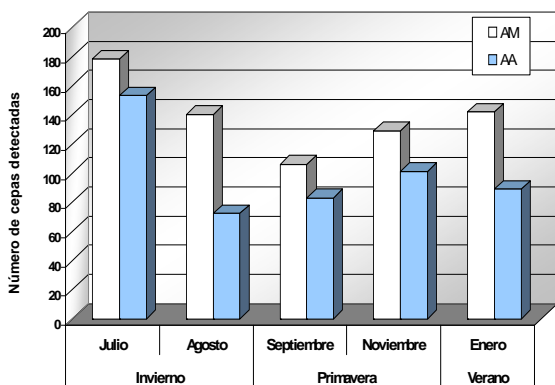


Figura 3. Variación mensual en maíz de todas las cepas de *Aspergillus* en todos los medios.

Cabe destacar que todos los granos de maíz no sólo presentaron especies de *Aspergillus*, sino un variado número de taxa, donde *Fusarium* (*F. verticillioides*) siempre presentó la mayor ocurrencia, seguido en menor medida por especies de *Penicillium*, *Rhizopus* y *Absidia* entre otras.

c) Soja:

Se detectó la presencia de un total de 476 colonias de *Aspergillus* en ambos medios, 214 en AMS y 262 en AAS, representando 15 taxa: *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. ellipticus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. sydowii*, *A. tamaritii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *E. amstelodami* y *E. rubrum* (Tabla 1).

En AMS las 5 especies con mayor frecuencia fueron: *A. flavus* y *E. amstelodami*, ambas con 30,37%, *E. rubrum* 10,75%, *A. ellipticus* 6,07% y *A. terreus* 5,14%, mientras que en ASS las de mayor frecuencia fueron: *A. flavus* (30,15%), *E. amstelodami* (22,9%), *E. rubrum* 17,56%, *A. candidus* (9,14%) y *A. versicolor* (4,58%).

*A. ostianus**, sólo se aisló en soja, mientras *A. parasiticus*, *A. sclerotiorum* y *A. wentii* no se presentaron en este substrato (Tabla 1) (*Figura 6, 3).

En noviembre y en ambos medio se observó el mayor número de presencia de *Aspergillus* (n=139), seguidos por agosto y julio (n=118 y 102). Septiembre y enero fueron similares entre sí (Tabla 1, Figura 4).

Aspergillus flavus, sigue siendo dominante en

ambos medios (30,25%), pero no en todos los meses.

La soja a diferencia del maíz, presentó una gran carga bacteriana, que disminuyó la presencia de los integrantes del género *Aspergillus*, como otros taxa fúngicos. *Fusarium* no estuvo presente y sólo se apreciaron pocas colonias de *Penicillium* y *Rhizopus* principalmente.

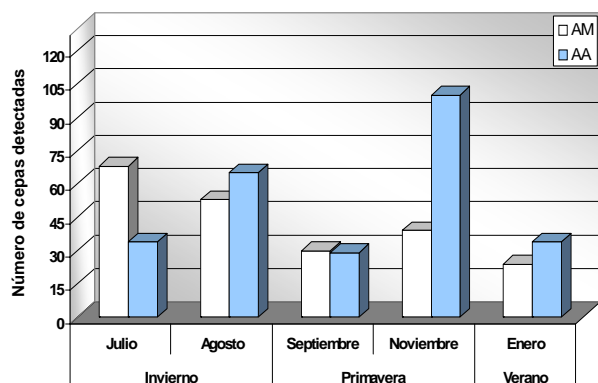


Figura 4. Variación mensual en soja de todas las especies de *Aspergillus* en ambos medios.

Tabla 2. Principales características de las cepas de *A. flavus* en CYA, AM y Agar Coco, aisladas de maíz y soja.

| Aspecto cabezas CYA | Aspecto cabezas AM | Rugosidad conidios 7 días | Rugosidad conidios 14 días | Mono y Biseriado | Halo azul fluorescente en Agar coco |
|--|--|---|---|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Radiadas laxas 33 cepas | Radiadas laxas 11 cepas | Lisos a inconspicuamente rugosos 38 cepas | Lisos a inconspicuamente rugosos 30 cepas | > 50% monoseriados 27 cepas | Sin halo 28 cepas |
| Radiadas laxas a columnares 17 cepas | Radiadas laxas a columnares 39 cepas | Finamente rugosos 6 cepas | Finamente rugosos 6 cepas | >50% biseriados 23 cepas | Halo tenue 13 cepas |
| | | Levemente rugosos 6 cepas | Levemente rugosos 14 cepas | | Halo intenso 9 cepas |

e) Aspectos morfofisiológicos de los *Aspergillus* de la sección Flavi en maíz y soja

La alta dominancia de *A. flavus* descrita anteriormente en ambos sustratos, fue seguida en baja proporción por *A. tamaritii* (0,75% en maíz y 0,21% en soja) y *A. parasiticus* (0,34% sólo en maíz) (Tabla 1).

1.- Macromorfología. Todas las cepas de *A. flavus* tuvieron un crecimiento rápido en CYA a los 7 días (46 - 79 mm y una media de 60,66 mm) y en AM en el mismo tiempo (47 - 70,3 mm y un promedio de 62 mm). Más del 81% de las cepas tuvieron medias entre los 55 y 70 mm. Visualmente, *A. flavus* presentó siempre colores más claros que *A. parasiticus* y *A. tamaritii*, con una tonalidad verde amarillenta que bajo un mismo tipo de iluminación, no marcó diferencias en CYA y MEA con las cartas de colores. Esta situación fue claramente comparable debido a la profusa esporulación de todos los aislamientos y no se modificó a pesar de la alta presencia de esclerocios. Los 10 aislamientos de *A. tamaritii*, presentes solo en noviembre y enero principalmente en maíz, fueron estables en sus tonalidades de café con un componente rojizo, no presentaron esclerocios y crecieron todas a 37°C (descartándose *A. pseudo-tamaritii*), por lo que todas se consideraron pertenecientes al tipo A. *A. parasiticus* se presentó en 4 ocasiones en ambos medios, en invierno y verano. Sólo la cepa aislada en invierno y en AM, produjo pocos esclerocios con una media de 756 x 718 µm.

2.- Micromorfología. Las características microscópicas principales en AM (solo se estudian en este medio) fueron: cabezas conidiales de aspecto radiadas laxas o radiadas laxas a francamente columnares. Las vesículas midieron entre 25,6 y 51,5 µm, con un promedio de 38,5

µm. Aproximadamente la mitad de las cepas presentaron mótulas y fiálides (Tabla 2).

Las rugosidades de los conidios a los 7 y 14 días, no presentaron marcadas diferencias. La mayoría de ellos, en ambos tiempos, tuvieron paredes con superficies lisas a finamente rugosas. Sólo se apreció a los 14 días, un aumento dentro de la categoría «Levemente rugosos».

Las medidas promedio de los diámetros o del eje más largo de los conidios, mediante el procesador de imágenes, a los 7 y 14 días, no presentó mayor variación y fueron de 3,97 y 3,96 µm respectivamente. De los 6226 conidios medidos, el tamaño menor fue de 2,51 µm y el mayor de 6 µm (datos no mostrados). Veinte cepas bajaron sus diámetros a los 14 días, 8 se mantuvieron iguales y 22 subieron.

En la figura 5 se muestra la dispersión de los diámetros de los conidios a los 7 y 14 días. Sólo algunas

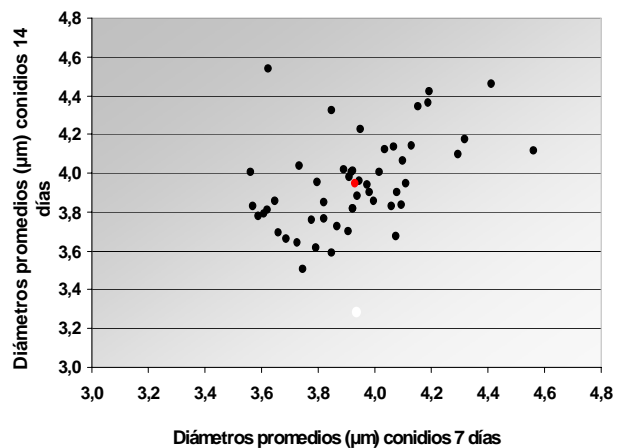


Figura 5. Relación entre 7 y 14 días de incubación para los diámetros mayores de los conidios de *A. flavus* en agar malta

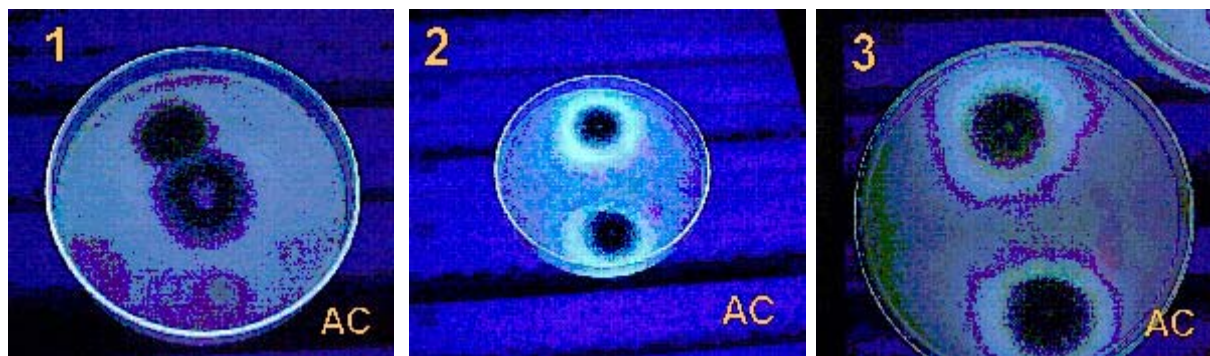


Figura 6.- Producción de halo azul fluorescente de las cepas de *A. flavus* en Agar Coco a los 5 días de incubación. 1.- Sin producción de halo, 2.- Halo fuertemente fluorescente, 3. Halo con tenue fluorescencia

cepas se alejan del promedio general, apreciándose que pocas aumentan o disminuyen sus diámetros en el tiempo, variando principalmente entre los 3.6 y 4.2 μm . El 86% de las cepas presentó formación de esclerocios (en CYA a los 14 días), todas correspondientes al tipo L (Promedio: 785.8 x 682.2 μm). En AM, el 52 % de las cepas también los presentó (tipo L), aunque las medidas promedios fueron levemente menores que en CYA. (746.0 x 634.2 μm).

3.- Presencia de Aflatoxinas en las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio de cultivo Agar Coco

De las 50 cepas analizadas, el 56 % no produjeron halo azul fluorescente bajo luz UV en Agar Coco, a los 5 días de incubación, el 18% fue fuertemente fluorescente y el 26% mostró una tenue fluorescencia (Tabla 2, Figura 6). Siete de las cepas aisladas en noviembre presentaron producción de halo azul fluorescente, en enero, agosto y septiembre 4 cepas y en julio 3 (datos no mostrados).

Ninguno de los 2 aislamientos de *A. parasiticus* seleccionados presentó halo fluorescente.

DISCUSION

Nuestro trabajo principalmente de orientación descriptiva, se realizó sólo para estudiar la presencia de las poblaciones del género *Aspergillus* (en especial la sección **Flavi**), en granos de maíz y soja de procedencia argentina, sin considerar el lugar de origen o los previos almacenamientos de éstos 2 productos. Considerando que el destino final de estos substratos constituye parte de la dieta animal en nuestros mercados nacionales, estimamos de interés analizar cualitativa y cuantitativamente la presencia de estos organismos que poseen características fisiológicas relevantes, como crecer a una baja actividad de agua y presentar una problemática sanitaria por la producción de variadas micotoxinas

(Chulze *et al.*, 1989; Moss, 1991; Hocking, 1991; Wicklow, 1995; Bayman & Cotty, 1993; EHSO, 2004).

El maíz y la soja, son los mayores productos generados en Argentina y la mitad de éstos, se exportan a mercados externos (Bolsa de Cereales, 1999). La presencia de variados hongos toxicogénicos en estos granos puede ocurrir ya sea durante el ciclo de su desarrollo en el campo (especialmente en el maíz), después de la cosecha y/o en el almacenamiento, alterando la seguridad de estos alimentos en las dietas humanas y animales. Entre estos hongos destacan en nuestra investigación los integrantes del subgénero **Circumdati**, como *A. ochraceus* productor de ocratoxina A, junto a otras especies no incluidas en esta sección, *A. versicolor* productor de sterigmatocistina, un precursor biosintético de aflatoxinas, pero con propiedades carcinogénicas menores que la aflatoxina B (Samson *et al.*, 2000). Sin embargo, en nuestros aislamientos preocupa la alta frecuencia de los integrantes de la sección **Flavi** (*A. flavus* y *A. parasiticus*), los cuales, frente a factores ambientales específicos, pueden producir algunas o todas las aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2), potentes metabolitos teratogénicos y carcinogénicos (Klich & Pitt, 1988; Cotty *et al.*, 1994; Wicklow, 1995; Woloshuk *et al.*, 1997).

Argentina tiene una amplia zona de cultivos de maíz y soja, que presentan distintos tipos de climas (cálidos y húmedos) y suelos que afectan en cierta medida la ecología y distribución de los hongos en general y las especies de *Aspergillus* en particular. No existe una tendencia general en la distribución de los integrantes de este género según bioma, pero sus distintas secciones parecen tener patrones de distribución diferentes, sin embargo, los climas templados y calurosos entre los 25 y 35° Latitud (sur o norte) parecen ser más favorables en la ocurrencia de especies del subgénero **Circumdati** y sus secciones (nuestro estudio), seguramente debido a la temperatura, cuando ésta se mantiene en rangos óptimos para estos hongos

(23° a 37°C) durante la mayor parte del año (Christensen & Tuthill, 1985; Klich, 2002b). Estas latitudes son las que corresponden a las zonas de cultivos de maíz y otros granos en la Argentina (Resnik, 1989).

El conocer la distribución de las especies, toxicogénicas de *Aspergillus*, permite encarar en los países productores programas de control dirigidos a las probables áreas de riesgo mediante la adecuada rotación de cultivos y el manejo de los rastrojos, fuente primaria de estos hongos (Resnik, 1997).

Los estudios de incidencia llevados a cabo en distintos substratos, en diversos países, muestran que ciertos cultivos son más susceptibles al ataque y colonización de determinados hongos toxicogénicos. A pesar de que este conocimiento no es completo, se sabe que el maíz, maní y algodón son muy susceptibles a la contaminación por hongos productores de aflatoxinas, en contraposición a la soja, trigo y sorgo (Resnik, 1997; Barros *et al.*, 2003).

Las poblaciones naturales de *A.flavus* que pertenecen a diferentes genotipos, incluyendo cepas con grupos de compatibilidad vegetativa genéticamente aisladas, fueron empleadas para determinar las diferencias de las poblaciones de *A.flavus* en campos de algodón y maní en USA (Cotty, 1999; Horn *et al.*, 1996; McAlpin *et al.*, 2002). *A.flavus*, se reconoce por ser una cepa que se reproduce sólo asexualmente con alguna potencialidad de recombinación por vía asexual entre los individuos morfológicamente similares. En la naturaleza las poblaciones son altamente polimórficas (incluso en la producción de aflatoxinas) y no puede reconocerse si las cepas son recombinantes o completamente clonales (Geiser *et al.*, 1998). La variación en la producción de aflatoxinas en dependencia de las localizaciones geográficas o las divergencias fisiológicas, ha recibido mayor atención en la literatura, por su importancia en salud pública (Niyo, 1990; Bayman & Cotty, 1993; Egel *et al.*, 1994; Cotty & Cardwell, 1999). Por la procedencia desconocida de nuestras muestras, no pudimos determinar la localización geográfica de las cepas consideradas toxicogénicas. En Argentina, estudios de la ocurrencia natural de aflatoxinas en diversos granos han demostrado que los niveles de contaminación son variables. En algunos años, éstos han superado lo establecido por las regulaciones internacionales especialmente en el maíz en la zona de Córdoba y sus alrededores (Chulze *et al.*, 1989; Resnick *et al.*, 1996; Etcheverry *et al.*, 1999; Picco *et al.*, 1999; Nesci & Etcheverry, 2002).

La diversidad también ha sido descrita en su morfología (Raper & Fennell, 1965; Saito *et al.*, 1986; Bayman & Cotty, 1993), así como en la virulencia (Cotty, 1989), la producción de conidios, el tamaño y

abundancia de los esclerocios (S y L) (Cotty, 1989; Egel *et al.*, 1994) entre otras características.

Los esclerocios juegan un importante rol en la supervivencia y dispersión de *A.flavus* (Wicklow *et al.*, 1984, 1988). Las cepas L producen más conidios y muestran ser favorables para la colonización, mientras que las cepas S se orientan más a la formación de estructuras de resistencia para la sobrevivencia y en la producción de mayor cantidad de aflatoxinas (Bayman & Cotty, 1993).

Todas nuestras cepas de *A.flavus* que formaron esclerocios, pertenecían al tipo L, las cuales, según la literatura pueden tener una menor capacidad de producir toxinas, entre el 30 y 45 % (Magnoli *et al.*, 1998). Sólo se han descrito cepas tipo S en Estados Unidos (Cotty, 1989; Doster & Michailides, 1994a, 1994b), Tailandia (Saito *et al.*, 1986) y Africa (Hesseltine *et al.*, 1970).

En Argentina, se han aislado especies del género *Aspergillus* en diversos granos, con clara dominancia de *A.flavus* y con menor frecuencia *A.parasiticus*, *A.nomius*, *A.candidus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.oryzae*, *A.parvulus*, *A.tamaritii* y *A.terreus*, entre otros (Gonzalez *et al.*, 1988, 1997; Magnoli *et al.*, 1998). Siempre la mayor información en maíz (granulados o farináceos compuestos) se refiere a los de la sección **Flavi** (Reddy, 1987; Nepote *et al.*, 1995, 1997; Resnik *et al.*, 1996; González *et al.*, 1997; Etcheverry, 1998; Horn & Dorner, 1998; Etcheverry *et al.*, 1999; Picco *et al.*, 1999; Nesci & Etcheverry, 2002; Barros *et al.*, 2003). En nuestro análisis del maíz, *A. flavus* mantiene esta dominancia sobre las otras especies del género y aunque desconocemos el origen de las muestras, no hay duda que su distribución no depende mayormente de la latitud de las zonas de cultivo, sino de la distribución de esta gramínea y la capacidad competitiva de esta especie en un ecosistema favorable.

La soja se mostró como un substrato diferente al maíz en ambos medios, pero mantuvo al igual que este último una alta diversidad de especies del género *Aspergillus*, a pesar de su menor cantidad numérica. La presencia en la mayoría de las muestras de una alta carga bacteriana de rápido crecimiento (no observada en maíz), pudo limitar en gran medida el desarrollo fúngico. Sin embargo, llama la atención que dos especies con diferentes rangos de actividad mínima de agua como son *A. flavus* y *E. rubrum* mantuvieron niveles similares de frecuencia (Samson *et al.*, 2000). La alta incidencia de especies de *Eurotium* también fue encontrada por Weidenbömer (1997) en soja, usando medios con baja actividad de agua. En una revisión de la micota asociada a las semillas, flores y vainas de la soja en USA se detectaron 14 especies de *Aspergillus* asociadas a las primeras (Roy *et al.*, 2000). *Eurotium*, se considera un colonizador primario en granos

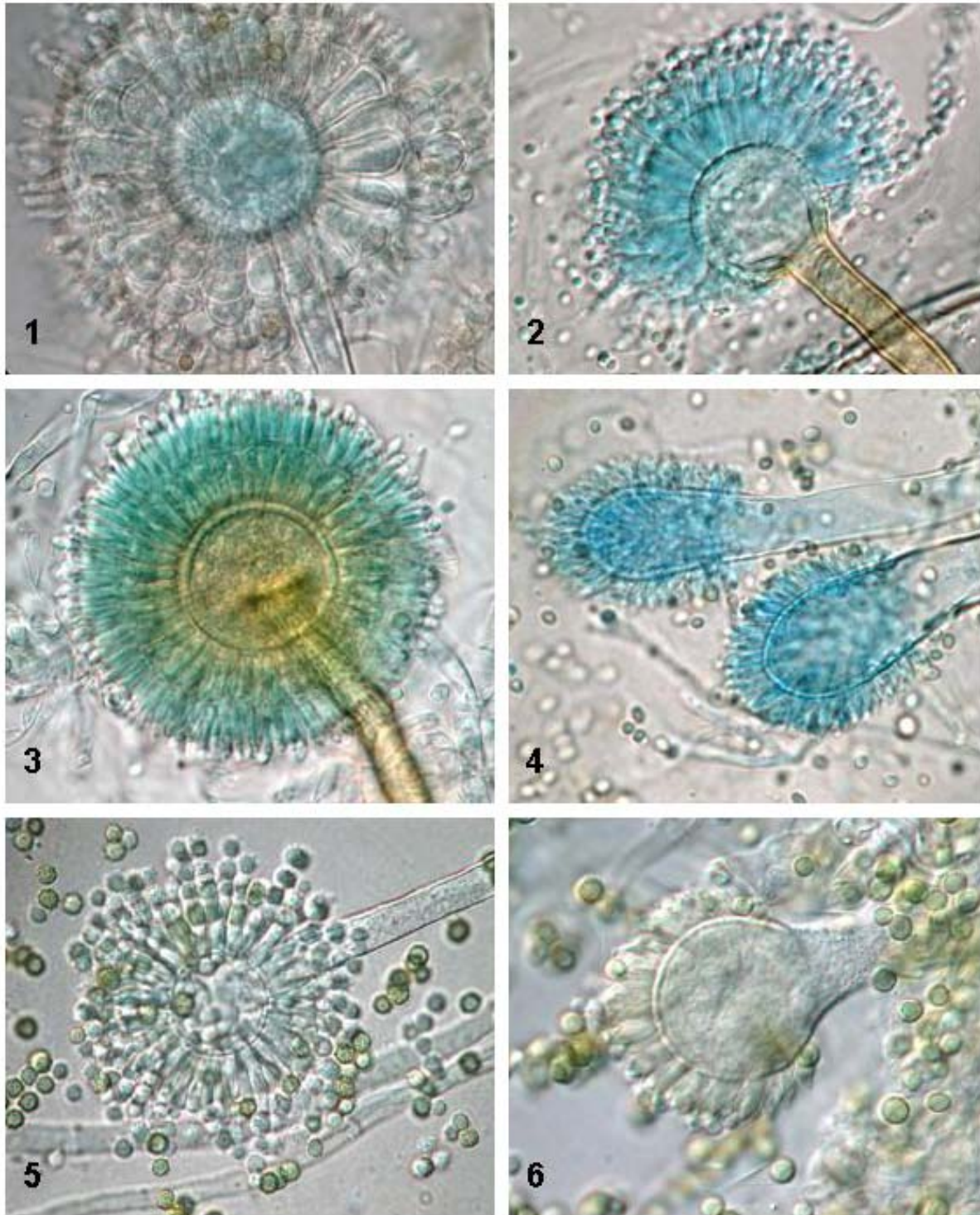


Figura 6. 1.- *Aspergillus ellipticus*. 2.- *A. ochraceus*. 3.- *A. ostianus*. 4.- *A. clavatus*.
5.- *A. parasiticus*. 6.- *A. flavus*.

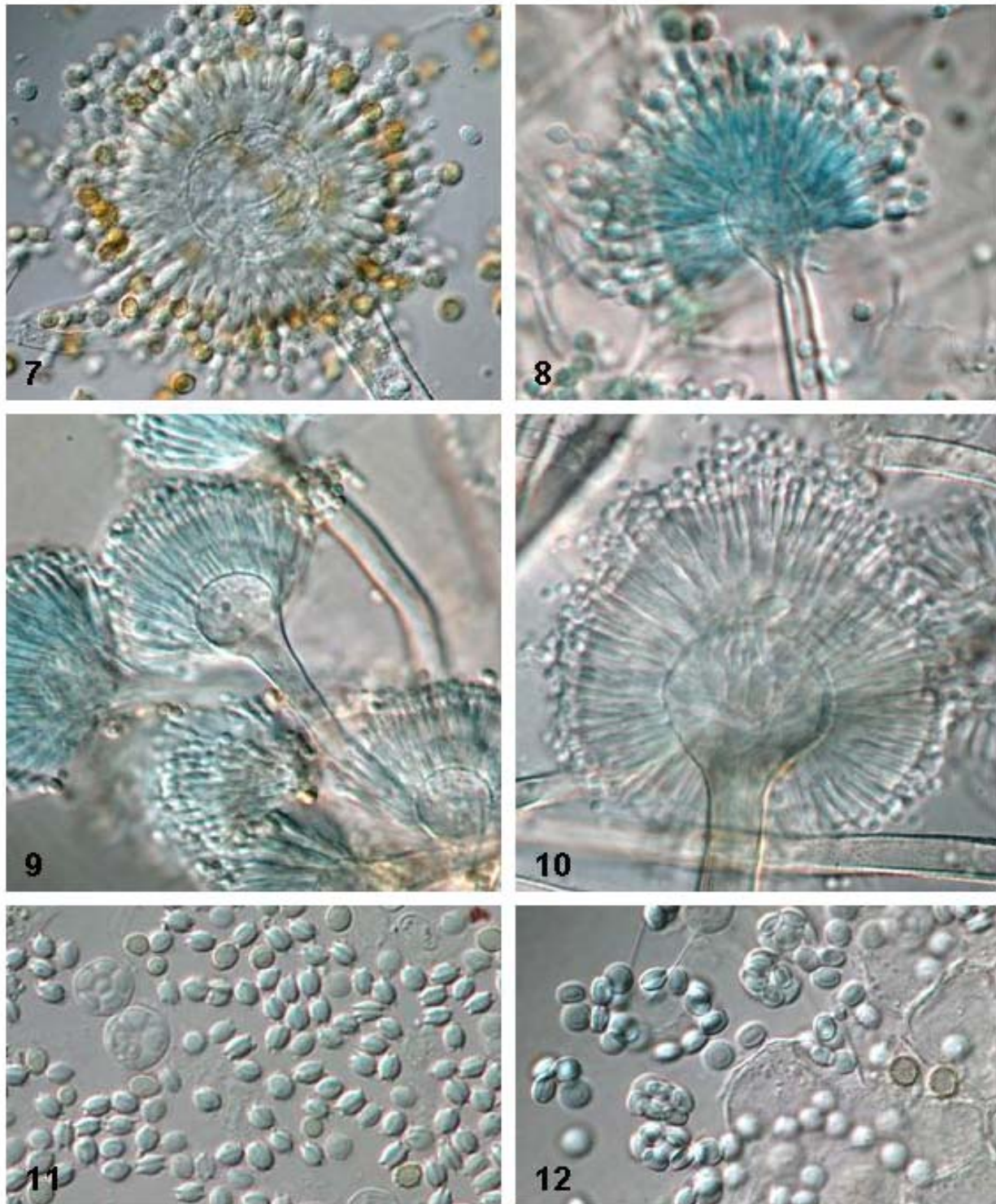


Figura 7. 7.- *Aspergillus tamarii*. 8.- *A. versicolor*. 9.- *A. terreus*. 10.- *A. sclerotiorum*.
11.- *Eurotium amstelodami*. 12.- *E. rubrum*.

almacenados que poseen bajo contenido de humedad y su alto aislamiento no es sorprendente en este sustrato (Fernandez, 1986; Weidenbörner, 1997).

La incubación de *A.flavus* y *A.parasiticus* en agar coco y su posterior exposición bajo luz UV, ha sido una rápida y efectiva prueba en la detección de cepas aflatoxicogénicas (Lin & Dianese, 1987). Davis *et al.* (1987), confirmaron por análisis químico la presencia de aflatoxinas en las cepas que producen halo azul fluorescente en este medio de cultivo. Las que producen halo intenso son potentes productoras de aflatoxinas, mientras las con halo tenue, son débiles productoras.

Aunque no contabilizamos la micota asociada al maíz debe destacarse la alta presencia de *Fusarium verticillioide*, otro gran colonizador de este cereal y cuyo conocido potencial toxicogénico no debe despreciarse (Ramírez *et al.*, 1996; Dalcero *et al.*, 1997; Chulze *et al.*, 1998).

La presencia de cepas de *A.flavus* toxicogénicas, entre otras del género con similares capacidades (no analizadas), constituye una situación de alerta que debe considerarse con anterioridad al transporte, almacenaje, distribución y destino de estos granos en el país.

CONCLUSIONES

Los 2 medios de cultivo empleados en metodología permitieron detectar una alta presencia de especies del género *Aspergillus* en maíz y soja (18 taxas y 1669 colonias). Diecisiete especies se detectaron en maíz y 15 en soja. El medio AMS, permitió los mayores aislamientos.

Los 3 principales taxa en ambos granos (66%) fueron: *A.flavus*, *Eurotium amstelodami* y *E.rubrum* y el subgénero *Circumdati* reunió con varios integrantes de sus secciones, prácticamente un 70% de todas las cepas del género. De las especies de la sección *Flavi*, sólo se aislaron *A.flavus*, *A.parasiticus* y *A.tamaritii*.

En maíz se contabilizó un mayor número de cepas, siendo *A. flavus* dominante en todos los meses de estudio, con niveles cercanos al 50 %, mientras en soja, tuvo porcentajes cercanos al 30%, pero no fue dominante en todos los meses, por la presencia de *E.*

amstelodami y *E. rubrum*.

La distribución mensual de las especies de *Aspergillus*, tuvo valores más altos en maíz en julio, mientras que en soja fue en noviembre.

De los estudios morfológicos en *A.flavus*, se destaca que, los aspectos de las cabezas en AM fueron mayoritariamente radiadas laxas a columnares,

prácticamente el 50 % de las cepas fueron biseriadas, sus conidios a los 7 y 14 días no presentaron mayores variaciones en sus diámetros, pero levemente en sus rugosidades y la mayoría de las cepas formaron esclerocios (tipo L).

En las cepas de *A.flavus* analizadas, la presencia de aflatoxinas en agar coco fue de un 44%, siendo noviembre el mes con mayor cantidad de cepas productoras. Las 2 cepas de *A.parasiticus* fueron negativas. Deben considerarse los taxa de otras secciones de *Aspergillus* como fuentes potenciales de diversas micotoxinas en estos granos, así como la alta presencia de *Fusarium verticillioide* en maíz, no sólo por su importancia en la dieta animal, sino por sus posibles repercusiones en salud pública.

La sola morfología no permitió determinar la presencia de diferentes grupos de compatibilidad vegetativa en los aislamientos de *A. flavus*, pero al parecer la gran mayoría pueden ser representativos de clones genéticos muy semejantes, quizás provenientes y dispersos en una misma área geográfica de cultivos.

Si bien es cierto que nuestros resultados cualitativos reflejan un patrón general de distribución geográfica y temporal de las poblaciones de *Aspergillus* en las zonas de siembra de maíz y soja, los resultados cuantitativos deben valorarse con cautela, debido al transporte, manipulación de muestras y submuestras y los cambios en el tiempo en el microambiente de sus contenedores plásticos, una situación que puede haber alterado la distribución de sus propágulos.

REFERENCIAS

- Al-Musallam, A. (1980). Revision of the Black *Aspergillus* Species. Drukkerij Elinkwink Bv., Utrecht.
- Bolsa de cereales (1999). Número Estadístico 1999/2000. Buenos Aires. Argentina Cereal Office. Government Printing Office.
- Barros, G.; Torres, A.; Palacio G. & Chulze, S. (2003). *Aspergillus* species from section Flavi isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83: 1303-1307
- Bayman, P.; & Cotty, P. (1993). Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. Can. J. Bot. 71:23-31
- Christensen, M. & Tuthill, D. E. (1985). *Aspergillus*: an overview. In: Samson RA, Pitt JI, (eds.) Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. New York: Plenum Press. pp. 195-209
- Chulze, S.; Bertinetti, C.; Dalcero, A., *et al.* (1989). Incidence of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol on corn in Argentina. Mycotoxin Research 5:9-12

- Chulze, S.; Ramirez, M.; Pascale, M. & Visconti, A.** (1998). Fumonisin production by, and mating populations of, *Fusarium* section *Liseola* isolates from maize in Argentina. *Mycol. Res.* 102:141-144
- Cotty, P. J.** (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, 79:808-814
- Cotty, P. J.** (1991). Effect of harvest date on aflatoxin contamination of cottonseed. *Plant Dis.* 75:312-314
- Cotty, P.J.; Bayman, P.; Egel, D.S. & Elias, K.S.** (1994). Agriculture, Aflatoxins and *Aspergillus*. In: Powell, K.A.; Renwick, A. & Peberdy, J.F. (eds.) *The Genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial applications*. Plenum Press, N.Y. pp.1-27
- Cotty, P. J., & Cardwell, K. F.** (1999). Divergence of West African and North American Communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2264-2266
- Dalcerro, A.; Magnoli, C.; Chiacchiera, S.; Palcios G.; Reynoso, M.** (1997). Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 137:179-84
- Davis, N. D.; Iyer, S. K. & Diener, U. L.** (1987). Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1593-1595
- Devegowda, G.; Radu, M.; Naza, R. A.; Swamy, H.** (1998). Micotoxin Picture Worldwide: Novel Solutions for their Counteraction en Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium. *Biotechnology in the Feed Industry. Passport of the Year 2000*. Nottingham University Press, U. K. pp. 241-255
- Doster, M. A. & Michailides, T. J.** (1994a). Development of *Aspergillus* molds in litter from pistachio trees. *Pl. Dis.* 78: 393-397
- Doster, M. A. & Michailides, T. J.** (1994b). *Aspergillus* molds and aflatoxins in pistachio nuts in California. *Phytopathology* 84:583-590
- Egel, D. S.; Cotty, P. J. & Elias, K. S.** (1994). Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *Flavi* that Vary in Aflatoxin Production. *Phytopathology* 84:906-912
- EHSO (Environment, Health and Safety Online)** «Aflatoxins in Your Food-and their Effect on Your Health». U.S. FDA (Food and Drug Administration) REGULATIONS. En internet: <http://www.ehso.com/ehshome/aflatoxin.php> (Consultado en 1-05-04)
- Etcheverry, M.; Nesci, A.; Barros, G.; Torres, A.; Chulze, S.** (1999). Ocurrance of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia* 147:37-41
- Farnochi, C.; Torres, A.; Rizzo I. & Varsavsky, E.** (1988). Incidencia de aflatoxinas, zearalenona y deoxinivalenol (DON) en maíz. V Congreso Argentino de Microbiología. Noviembre. Mar del Plata, Argentina.
- Fernández Pinto, V.** (1986). Estudio de Factores que condicionan la producción de aflatoxinas en soja: influencia de la variedad, actividad acuosa, temperatura tiempo de incubación. Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Geiser, D. M.; Pitt, J. I. & Taylor, J. W.** (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:388-393
- González, H. H. L.; Resnik, S. L. & Vaamonde, G.** (1988). Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentina corn. *Int.J.Food Microbiol.* 6:179-183
- Gonzalez, H.H.L.; Martinez, E.J. & Resnik, S.L.** (1997). Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Micopathologia* 139:35-41
- Hesseltine, C. W.; Shotwell, O. L.; Smith M.; Ellis J. J.; Vandegraft, E.; Shannon, G.** (1970). Production of various aflatoxins by strains of the 6 series. In: M. Herzberg (ed.), *Toxin microorganisms: mycotoxins, botulism*. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C. pp.202-210
- Hocking, A. D.** (1991). Xerophilic fungi in intermediate and low moisture foods. *Handbook of Applied Mycology. Vol.3: Food and Feeds* 3:69-97
- Horn, B.; Greene, R. L.; Sobolev, V. S.; Dorner, J. W.; Powell, J. H.; Layton, R. C.** (1996). Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia* 88: 574-587
- Horn, B.W. & Dorner, J.W.** (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia* 90: 767-776
- Klich, M. A. & Pitt, J. I.** (1988). A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.
- Klich, M. A.** (2002a). Identification of Common *Aspergillus* species. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center New Orleans, Louisiana USA.
- Klich, M. A.** (2002b). Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94:21-27
- Kozakiewicz, Z.** (1989). *Aspergillus* species on stored products *Micological Papers. N° 161*. CAB. International
- Kurtzman, C. P.; Horn, B.W. & Hesseltine, C.W.** (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53:147-158
- Lin, M. T. & Dianese, J. C.** (1976). A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 66:1466-1469
- Magnoli, C.; Dalcerro, A.M.; Chiacchiera, S.M.; Miazzo, R.; Saenz, M.A.** (1998). Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia* 142:27-32
- McAlpin, C. E.; Wicklow, D. T. & Horn, B. W.** (2002). DNA Fingerprinting Analysis of Vegetative Compatibility Groups in *Aspergillus flavus* from a Peanut Field in Georgia. *Plant Dis.* 86: 254-258
- Moss, M.O.** (1991). *Mycology of cereal grain and cereal products*. *Developments in Food Science* 28:23-51
- Nepote, M.; Saubois, A. & Basilico, J. C.** (1988). Incidencia de micotoxinas en maíz proveniente de un molino harinero de la ciudad de Santa Fe. V Congreso Argentino de Microbiología. Noviembre Mar del Plata, Argentina.
- Nepote, M.C; Saubois, A.; Beccaria, A. & Basilico, J.** (1994). Grado de contaminación por aflatoxinas y zearalenona

- en maíz y subproductos procesados en un molino harinero de la ciudad de Santa Fe (Argentina). Rev. Iberoam. Micol. 11:37-39
- Nepote, M.C.; Piontelli, E. & Saubois, A.** (1995). Evaluación micológica de granos de sorgo de la provincia de Santa Fe. Proceedings of the VII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina; p. 10.
- Nepote, M.C.; Piontelli, E. & Saubois, A.** (1997). Occurrence of *Aspergillus flavus* strains and aflatoxins in corn from Santa Fe, Argentina. Arch. Latinoam. Nutr. 47:262-4
- Nesci, A., & Etcheverry, M.** (2002). *Aspergillus* section Flavi populations from field maize in Argentina. Letters in Applied Microbiology 34:343-348
- Niyo, K. A.** (1990). Mycotoxins: economic and health risks. Council on Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa. No. 116.
- Osweiler, G. D.** (1992). Mycotoxins en Diseases of Swine. 7th Edition, Wolfe Publishing, London. pp. 735-743.
- Picco, M.; Nesci, A.; Barros, G.; Cavaglieri, L.; Etcheverry, M.** (1999). Aflatoxin B1 and fumosin B1 in mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on maize. Nat Toxins. 7:331-6
- Picco, A.M & Piontelli, E.** (2005). VII. Muffe contaminanti di alimenti e derrate alimentari. En: Rondanelli, E.G.; Fabbi, M. & Marone, P. (Eds.) Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Selecta Medica, Pavia. pp. 845-897
- Pildain, M. B.; Vaamonde, G. & Cabral, D.** (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. Int. J. Food Microbiol. 93:31-40
- Ramírez, M.; Pascale, M.; Chulze, S.; Reynoso, M.; March, G.; Visconti, A.** (1996). Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids growth in Argentina. Mycopathologia 135:29-34
- Raper, K. B. & Fennell D. I.** (1965). The Genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Reddy, B. N.** (1987). Aflatoxin producing potential of *Aspergillus flavus* isolates from sorghum. Indian Phytopathology 40: 550-551
- Resnik, S. L.** (1988a). Almacenamiento de granos. Prevención de la contaminación por hongos y micotoxinas. Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas, 14 al 18 de noviembre 1988, Buenos Aires, Argentina.
- Resnik, S. L.** (1988b). Situación del problema de las micotoxinas en la República Argentina. Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas. Buenos Aires, Argentina. 14-18 de noviembre 1988
- Resnick, S. L.** (1989). Factores que inciden en la aparición de micotoxinas desde la producción primaria hasta el almacenamiento. Jornada Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis». Programa Postcosecha. Estación experimental La Platina. Serie La Platina n° 13, Santiago Chile.
- Resnick, S.L.; Neira, S.; Pacin, A.; Martínez, E.; Apro, N.; Latreite, S.** (1996). A survey of the natural occurrence of aflatoxin and zearalenone in Argentina field maize: 1983-84. Food Additives and Contaminants. 13:115-120
- Resnick, S. L.** (1997). Micotoxinas. Rev. Arg. Prod. Anim., Bs. As. 17:221-225
- Saito, M.; Tsuruta, O.; Siriacha, P.; Kawasugi, S.; Manabe, M.; Buangsuwon, D.** (1986). Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strain of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 24: 41-46
- Samson, R. A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J. C. & Filtenborg, O.** (2000). Introduction to Food-Borne Fungi. 6th edn. CBS, Utrecht.
- Van Egmond, H.P.** (1989). Introduction. In: Van Egmond, (ed.) Micotoxin in dairy products. Elsevier, London, pp. 1-9
- Varsavsky, E.; Vaamonde, G. & Resnik, S. L.** (1985). Micotoxinas: Panorama actual en la República Argentina. SECYT.
- Weidenbörner, M.** (1997). The mycoflora of soybean seeds in relation to the used plating medium DG 18 or MSA. Nahrung 41(S): 239-240
- Weidenbörner, M.; Berleth, M.; Krämer, J.; Kunz, B.** (1996). Investigations about the mycoflora of selected samples of the german cereal crop 1994. Adv. Food Sci. (CMTL) 18:103-106
- Wicklow, D. T.; Horn, B. W.; Burg, W. R. & Cole, R. J.** (1984). Sclerotium dispersal of *Aspergillus flavus* and *Eupenicillium ochrosalmoneum* from maize during harvest. Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 299-303
- Wicklow, D. T.; Dowd, P. F.; Tepaske, M. R., & Gloer, J. B.** (1988). Sclerotial metabolites of *Aspergillus flavus* toxic to a detritivorous maize insect (*Carpophilus hemipterus*, Nitidulidae). Trans. Br. Mycol. Soc. 91: 433-438
- Wicklow, D.T.** (1991). Epidemiology of *Aspergillus flavus* in corn. In Aflatoxin in Corn: New perspectives (O. L. Shotwell & C. R. Hurburgh Jr. (Eds.)) pp. 315-328. Iowa Agriculture and Home Economics Experiments Station Research Bulletin 599: Ames, Iowa.
- Wicklow, D.T.** (1995). The Mycology of Stored Grain: An Ecology Perspective. Stored-Grain Ecosystems 7:197-249
- Woloshuk, C.P.; Cavaletto, J.R. & Cleveland, T.E.** (1997). Inducers of Aflatoxin Biosynthesis from Colonized Maize Kernels Are Generated by an Amylase Activity from *Aspergillus flavus*. Biochemistry and Cell Biology 87:164-169
- Zumo, N. & Scott, G.E.** (1990). Relative aggressiveness of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in maize in Mississippi. Plant Disease 74:978-981