

## ASPERGILLUS FLAVUS Y A. PARASITICUS EN MANI CULTIVADO EN LA PROVINCIA DE CORDOBA (ARGENTINA): CARACTERISTICAS DIFERENCIALES Y CAPACIDAD AFLATOXICOGENICA

Por G. VAAMONDE, C. DEGROSSI, R. COMERIO Y V. FERNANDEZ PINTO<sup>1</sup>

**Summary** *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* from peanuts grown in province of Córdoba (Argentina): characters for differentiation and aflatoxin-producing potential. As part of a program of genetic control of aflatoxin contamination in peanuts, 44 strains belonging to *Aspergillus flavus* group isolated from peanuts were identified and their aflatoxin producing ability was assessed. Conidial wall texture and colour of colonies in agar Czapek-yeast extract (CYA) and in potato-dextrose agar (PDA) were the most effective criteria for distinguishing *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Isolates varied widely in their capacity to produce different aflatoxins. Twenty four of 35 *A. flavus* strains were aflatoxicogenic (68.6%), most of them producing only type B aflatoxins. Of 9 strains identified as *A. parasiticus*, 7 produced aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>. Some of the isolates are very potent producers of aflatoxins.

### INTRODUCCION

El grupo *Aspergillus flavus* descrito por Raper y Fennell (1965) en su monografía sobre el género *Aspergillus* comprende especies de gran importancia económica. Además de causar el deterioro de alimentos, las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* cobraron notable importancia a partir de los comienzos de la década del sesenta, cuando se descubrió que son productoras de aflatoxinas (Sargeant *et al.*, 1961). Estos metabolitos secundarios, se encuentran entre los hepato-cancerígenos naturales más potentes que se conocen. Su presencia en los alimentos constituye un serio peligro para la salud humana y animal y debe ser estrictamente controlada. Dado que son sustancias sumamente estables al calor y a otros agentes físicos y químicos, es prácticamente imposible eliminarlas de los alimentos en forma económica y eficaz (Smith & Moss, 1985). Por lo tanto, el control del problema radica en la prevención de la contaminación. Los alimentos más frecuentemente contaminados son los de origen vegetal; y entre ellos algunos cereales y oleaginosas, como el maíz y el maní, son muy propensos a la contaminación con aflatoxinas (CAST, 1989). La búsqueda de variedades resistentes es una de las estrategias propuestas para superar este problema y en

este sentido se han realizado numerosos estudios en diversos países (Mixon & Rogers, 1973; Mehan *et al.*, 1982; Widstrom & Zuber, 1983) que han demostrado, en algunos casos, la existencia de ciertos genotipos en los cuales se produce la toxina en cantidades muy limitadas frente a otros mucho más susceptibles. La cantidad de toxina producida depende también en gran medida de la cepa fúngica (Mehan *et al.*, 1991). Por esta razón se recomienda que los estudios de mejoramiento genético se realicen empleando varias cepas autóctonas de diferente capacidad colonizadora y aflatoxicogénica, para poder establecer fehacientemente si alguna de las variedades o cultivares presenta resistencia a esta contaminación.

*Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* están ampliamente diseminados en la naturaleza y son contaminantes comunes de diversos productos agrícolas. *A. parasiticus* es frecuente en las áreas tropicales y subtropicales, en tanto *A. flavus* predomina en los cultivos de climas templados. Los aislamientos de ambas especies presentan gran variabilidad respecto del tipo y cantidad de aflatoxinas producidas. Estudios realizados con cepas aisladas de diferentes cultivos en diversas regiones del mundo, permiten afirmar que aproximadamente el 70% de los aislamientos de *A. flavus* son toxicogénicos (Lacey, 1986) y generalmente producen aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. Respecto de *A. parasiticus*, la mayoría de las cepas resultan ser potentes productoras de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

Ambas especies difieren también en su capacidad para invadir los tejidos de la planta huésped. *A.*

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Química Orgánica (Area Bromatología), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón II, 3er. piso, (1428) Buenos Aires.

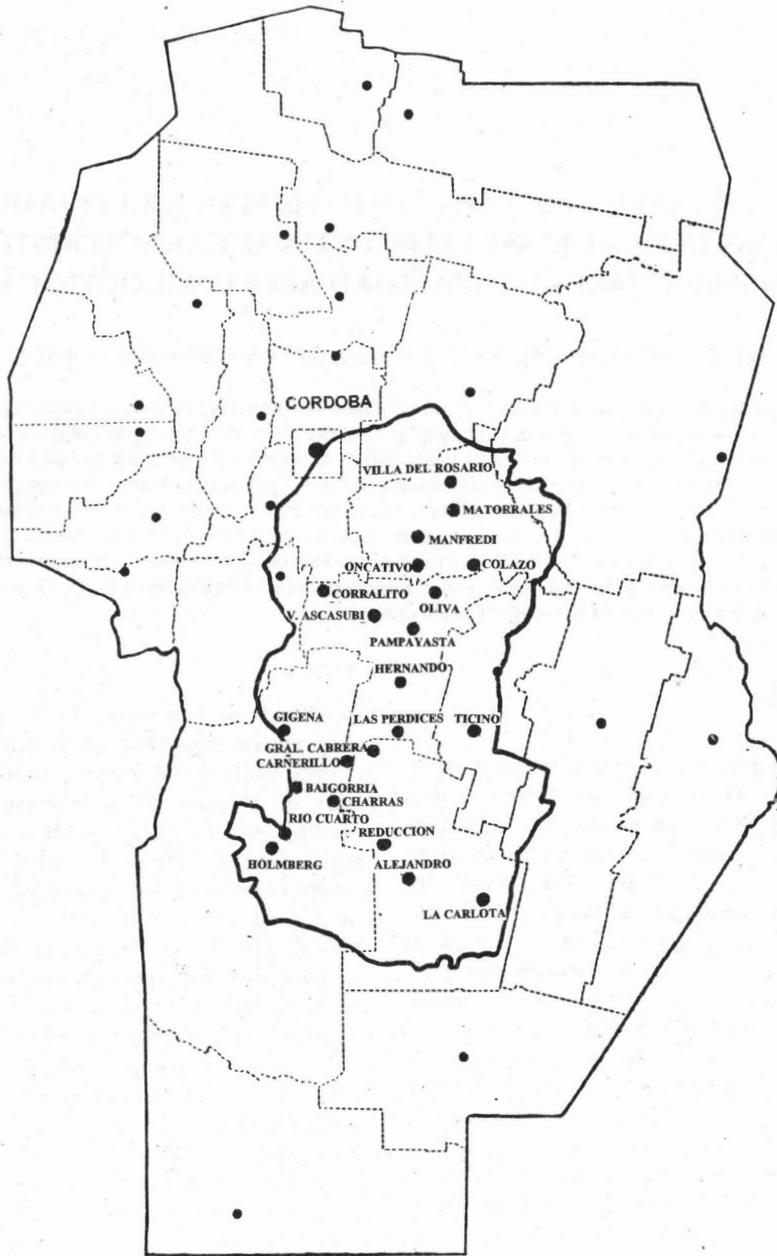


Fig. 1.— Zona manisera núcleo argentina (provincia de Córdoba).

Ambas especies difieren también en su capacidad para invadir los tejidos de la planta huésped. *A. parasiticus* reside en el suelo y causa problemas en el maní, pero está raramente asociado con las partes aéreas de las plantas. En cultivos tales como maíz, semillas de algodón, nueces de pacana, arroz, sorgo, etc., predomina *A. flavus*, mejor adaptado al ambiente aéreo. Es así que los análisis de aflatoxinas en maní

frecuentemente demuestran la presencia de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, en tanto que en maíz, por ejemplo, es común encontrar solamente las aflatoxinas de tipo B. Aparentemente, *A. flavus* es predominante sobre *A. parasiticus* en la mayoría de los productos. La proporción de *A. parasiticus* entre los aislamientos de maní es un poco más elevada que la observada en otros granos (Davis & Diener, 1983).

El presente trabajo constituye la etapa preliminar de un proyecto de mejoramiento genético del maní que se cultiva en nuestro país, cuyo objetivo es detectar una probable resistencia tanto a la invasión por parte del hongo como a la subsiguiente producción de aflatoxinas. Para ello es necesario contar con cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* capaces de colonizar agresivamente el sustrato y de producir altos niveles de toxinas. Esas cepas serán utilizadas para la evaluación del genotipo hospedante mediante inoculación artificial en condiciones controladas. Teniendo en cuenta las interacciones específicas hospedante-patógeno que han sido mencionadas, se considera importante que los aislamientos provengan del área donde luego se difundirán los cultivos mejorados. Además de seleccionar un grupo de cepas con esas características, se ha puesto énfasis en determinar cuáles son los criterios taxonómicos de mayor utilidad para la diferenciación de las dos especies aflatoxicogénicas, ya que los diversos sistemas propuestos para su identificación (Raper & Fennell, 1965; Murakami, 1971; Christensen, 1981) no son ampliamente aceptados por todos los micólogos (Klich & Pitt, 1988).

#### MATERIALES Y METODOS

**Muestras.** Se analizaron 32 muestras de maní procedentes de 22 localidades ubicadas en la zona manisera de la Provincia de Córdoba. El muestreo fue realizado por personal de la Estación Experimental Regional Agropecuaria Manfredi (INTA) a nivel de productores y/o acopiadores, procurando recolectar muestras del mayor número posible de localidades de dicha zona (Fig. 1). Las muestras correspondían a la cosecha 1993 y los aislamientos se realizaron durante los dos meses posteriores a su recolección.

**Aislamientos.** Se empleó el método de plaqueo directo en agar malta sal (King *et al.*, 1986). Se colocaron 5 granos en cada caja y se los incubó a 25°C realizando observaciones diarias. Se aislaron los *Aspergillus* de color verde amarillento, típico del grupo *A. flavus*. Se descartaron los escasos aislamientos que presentaron con el tiempo cambio de color a tonalidades castañas.

**Identificación.** Se utilizó la clave de Pitt y Hocking (1985) y las sugerencias de Klich y Pitt (1988). Cada cepa fue sembrada en agar Czapek extracto de levadura (ACY) agar extracto de malta (AEM) y agar glicerol 25% nitrato (G25N) e incubadas a 25°C, 37°C y 5°C. La mayoría de las características fueron observadas a los 7 días de incubación.

Las cepas fueron transferidas a agar papa dextrosa (APD) en tubos con tapa de rosca para su conservación. En este último medio también se observó el color de los cultivos a los 14 días.

**Características macroscópicas.** Se midieron los diámetros de las colonias en los tres medios de cultivo luego de 7 días de incubación a las diferentes temperaturas. El color de las colonias en ACY y AEM se registró también a los 14 días, según la carta de colores de Maerz y Paul (1930). Se registró la presencia de esclerocios a los 21 días de incubación. Las cepas también fueron cultivadas en el medio diferencial AFPD (*Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar, Pitt *et al.*, 1983) a 30°C y se observó el color del reverso de las colonias a las 48 y 72 horas.

**Características microscópicas.** Las características microscópicas observadas fueron: presencia de cabezuelas con métulas y fiálides, o con fiálides solamente; tamaño y rugosidad de los conidios y rugosidad de los estípites.

**Producción de aflatoxinas.** Para la detección de las aflatoxinas producidas por las cepas en estudio se utilizó un método rápido (método de «screening») de acuerdo a la técnica de Filtenborg y Frisvad (1980), que consiste en aplicar directamente sobre la placa cromatográfica un pequeño cilindro de agar cortado con un sacabocado de la colonia en agar ACY y a los 7 días.

Las cepas que dieron resultados negativos o dudosos en el método rápido, fueron probadas en su capacidad toxicogénica empleando arroz como sustrato, según la técnica de Shotwell *et al.* (1966).

De las cepas toxicogénicas se seleccionaron seis (tres *A. flavus* y tres *A. parasiticus*) para realizar la determinación cuantitativa de las aflatoxinas producidas. Estos aislamientos fueron cultivados en maní adquirido en el comercio, del cual se seleccionaron granos sanos y se comprobó que estaban exentos de aflatoxinas. Muestras de este material (30 g) fueron desinfectadas de la siguiente forma: a) alcohol 70%, 30 segundos; b) ClONa 2%, 2 minutos; c) tres enjuagues sucesivos con agua estéril; d) calentamiento a 60°C durante 30 minutos, en baño de agua, tratamiento que se repitió cada 24 horas, durante tres días consecutivos. A los granos así tratados se les agregó 5 ml de agua estéril y 1 ml de una suspensión de esporas de la cepa en estudio (10<sup>6</sup> esporas/ml) preparada según González *et al.* (1987) en Erlenmeyer de 500 ml. Se incubó 7 días a 30°C y se extrajo según el método BF (AOAC, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSION

**Distribución geográfica de las cepas.** Al iniciar el presente estudio, el objetivo fue obtener un conjunto de cepas (no menos de 30) procedentes de las diferentes localidades del área manisera núcleo argentina, ubicada en la región centro-sur de la provincia de Córdoba (Fig. 1). De las 32 muestras analizadas, procedentes de 22 localidades, se aislaron en total 44 cepas (Tabla 1). *A. flavus* se aisló del 60% de las muestras analizadas, en tanto que *A. parasiticus* estuvo presente en el 20% de las mismas. Se encontraron cepas de *A. flavus* y/o *A. parasiticus* en las muestras procedentes de todas las localidades excepto dos: Corralito y Hernando (de esta última se analizaron 4 muestras, todas con resultados negativos). En base a estos resultados, se puede afirmar que las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* están ampliamente distribuidas en la zona manisera de la provincia de Córdoba.

Criterios taxonómicos

Existen algunos caracteres morfológicos que han sido históricamente considerados importantes para distinguir especies del grupo *A. flavus*. A los considerados por Thom y Church (1926) y Raper y Fennell (1965), se han agregado otros adicionales en estudios taxonómicos más recientes (Christensen, 1981; Pitt & Hocking, 1985; Klich & Pitt, 1988). Discutiremos los criterios taxonómicos más importantes desde el punto de vista de la diferenciación de las especies que interesan a los fines del presente trabajo, los cuales figuran en la Tabla 2.

Características macroscópicas

**Color de las colonias.** *A. flavus* y *A. parasiticus* pertenecen al grupo de los *Aspergillus* verde-amari-llentos («yellow-green aspergilli»). Se caracterizan

Tabla 1.— Número de muestras analizadas, número de cepas y capacidad toxicogénica de *A. flavus* y *A. parasiticus* aislados de maní procedente de 22 localidades de la zona manisera argentina (Pcia. de Córdoba).

Localidad	Nº de muestras analizadas	<i>A. flavus</i>		<i>A. parasiticus</i>	
		Nº cepas aisladas	Nº cepas toxicogénicas	Nº cepas aisladas	Nº cepas toxicogénicas
Baigorria	1	-	-	1	-
Holmberg	1	2	2(B1)	-	-
Gigena	1	1	1(B1)	1	1(B1B2G1G2)
Las Perdices	2	4	3(B1G1/B1/B1*)	-	-
Corralito	1	-	-	-	-
Río Cuarto	1	1	1(B1)	-	-
Hernando	4	-	-	-	-
Matorrales	2	2	1(B1)	-	-
Oliva	2	-	-	1	-
Charras	1	1	1(B1*)	-	-
Villa del Rosario	1	4	2(B1G1/B1*)	-	-
General Cabrera	1	1	1(B1*B2)	1	1(B1B2G1G2)
Carnerillo	1	1	1(B1*)	2	2(B1B2G1G2)
Alejandro	2	2	2(B1*/B1G1)	-	-
Manfredi	3	2	1(B1)	1	1(B1B2G1G2)
Reducción	2	1	-	2	-
Pampayasta	1	-	-	2	2(B1G1G2)
Villa Ascasubi	1	2	2(B1*/B1B2)	-	-
La Carlota	1	1	-	-	-
Ticino	1	4	1(B1G1)	-	-
Colazo	1	4	4(B1/B1/B1G1 B1B2G1)	-	-
Oncativo	1	2	1(B1)	-	-
Total de cepas aisladas		35	24	9	7

(\*) indica que la toxina se produce en gran cantidad.

Tabla 2.— Características diferenciales de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*

Criterio	<i>A. flavus</i> (%) (a)	<i>A. parasiticus</i> (%) (a)
Color verde claro (b)	100	-
Color verde oscuro (b)	-	100
Pigmentación en AFPA	100	100
Presencia de métulas	90	55
Ausencia de métulas	10	45
Estípite liso	17	45
Estípite rugoso	83	55
Conidios lisos	94	-
Conidios rugosos	6	100
Esclerocios	40	-
Aflatoxinas sólo tipo B	49	-
Aflatoxinas de tipo B y G	17	78
No producen aflatoxinas	34	22

(a) Porcentaje de cepas de cada especie que presentan esa característica.

(b) El color de las colonias se observó en agar extracto de malta (MEA) a los 7 días y en agar papa dextrosa, donde es muy notoria la diferencia de color de ambas especies a los 14 días de incubación.

(-) Ninguna de las cepas estudiadas presenta esa característica.

por el color verde de sus conidios, que permanece en el tiempo, en tanto que en otras especies del grupo *Aspergillus flavus*, tales como *A. oryzae* y *A. sojae*, el color verde amarillento inicial se torna de color amarillo con tonalidades ocre o castañas en los cultivos viejos. En general, las colonias de *A. parasiticus* son de color verde más oscuro (P24 L3) que las de *A. flavus* (P22 L4). Esta diferencia se acentúa con el tiempo de incubación y es más evidente en los cultivos en APD que en los de AEM. Los cultivos de *A. flavus* con el tiempo pueden tornarse verde grisáceos. Ambas especies a menudo presentan zonas flocosas blanquecinas asociadas a la disminución de su capacidad para esporular, ya que el color verde característico está limitado a las paredes de los conidios (Wicklow, 1983). Klich y Pitt (1988), señalan que la diferencia de color entre ambas especies no es suficientemente marcada ni consistente como para diferenciarlas; sin embargo, en nuestra experiencia, es uno de los caracteres macroscópicos más distintivos. Wicklow (1983) también lo señala como una de las características que muestran mayor estabilidad en las especies de este grupo, por lo cual ha sido tenida en cuenta por diversos taxónomos (Thom & Church, 1926; Raper & Fennell, 1965; Christensen, 1981). Recientemente, Pitt (1992) señala que la diferencia de color de los conidios entre *A. flavus* (verde amarillento) y *A. parasiticus* (verde oscuro) es fácilmente reconocible en el medio DRBC (agar dicloran - rosa de bengala - cloramfenicol). Los resultados de un estudio colaborativo realizado entre varios labo-

ratorios para evaluar la eficacia de algunos medios de cultivo para diferenciar ambas especies mostraron una alta correlación entre la diferenciación realizada en base al color de las colonias en este medio respecto de la realizada en base a la morfología microscópica (Pitt, 1992).

**Pigmentación en el medio AFPA.** Este medio fue diseñado por Pitt *et al.* (1983) para la detección rápida de las especies aflatoxicogénicas, ya que *A. flavus* y *A. parasiticus* presentan una intensa coloración naranja en el reverso de las colonias debida a la presencia de citrato férrico. El pigmento suele difundir al medio de cultivo. Todas las cepas estudiadas, tanto *A. flavus* como *A. parasiticus*, produjeron la típica coloración naranja en el reverso (Tabla 2). Esta característica puede considerarse como una confirmación de que la cepa en estudio pertenece a alguna de estas dos especies. Otras especies del grupo del *Aspergillus flavus*, como *A. oryzae* y *A. sojae*, no producen esta pigmentación u ocasionalmente pueden presentar una coloración mucho menos intensa que la de *A. flavus* y *A. parasiticus*. *A. tamarii* produce colonias con reverso de color castaño oscuro en este medio, que puede ser útil como característica diagnóstica.

**Esclerocios.** Según Klich y Pitt (1988), los esclerocios son producidos por algunos aislamientos de *A. flavus* y de *A. parasiticus*, así como también por *A. oryzae*, por lo que aparentemente esta característica no tendría importancia taxonómica.

Thom y Church (1926) han caracterizado cepas de *A. flavus* que producen abundantes esclerocios, escasos esclerocios o que no los producen en absoluto. Según diversos autores, *A. parasiticus* también muestra gran variabilidad en relación a la presencia de estas estructuras. Nosotros encontramos que el 40% de las cepas clasificadas como *A. flavus* producen esclerocios cuando se las cultiva en AEM, algunas de ellas en forma muy abundante, en tanto que ningún aislamiento clasificado como *A. parasiticus* las produjo en este medio. Es reconocida la importancia de los esclerocios como estructuras de supervivencia. En el caso de hongos fitopatógenos representan una fuente importante de inóculo, por lo cual constituyen una característica relevante cuando *A. flavus* coloniza cereales y oleaginosas en la etapa precosecha.

Se ha comprobado que la germinación de los esclerocios en *A. flavus* y *A. parasiticus* es esporogénica, observándose cabezas conidiales verde-amarillentas producidas directamente sobre la superficie de los esclerocios incubados sobre arena esterilizada a 25°C, 28°C o 37°C luego de 48 a 72 horas de incubación. Esto constituiría un importante mecanismo que le permitiría al hongo diseminar el inóculo conidial primario. Por tanto, la presencia de estas estructuras de resistencia es considerada como una característica importante de las cepas aisladas, a fin de seleccionar aquéllas con mayor capacidad colonizadora para ser utilizadas en estudios de resistencia varietal del maíz.

#### Características microscópicas

**Estípites.** Respecto de la longitud de los estípites, las cepas aisladas en el presente trabajo se comportan de acuerdo a lo descrito en la literatura: aquellas clasificadas como *A. flavus* tienen estípites más largos que las de *A. parasiticus* (en esta última especie la longitud, en general, no sobrepasa los 500 µm). Otra característica de los conidióforos observada en *A. flavus* y *A. parasiticus* es la rugosidad de la pared, en contraste con las paredes lisas que presentan las otras especies del grupo *Aspergillus flavus* (*A. oryzae* y *A. sojae*). La Tabla 2 muestra que las cepas de *A. flavus* aisladas en el presente estudio presentan mayoritariamente estípites rugosos (83% de las cepas), en tanto que en *A. parasiticus* se encuentra aproximadamente la misma proporción de cepas con estípites liso o rugoso. Wicklow (1983), atribuye a los conidióforos de paredes gruesas y rugosas una función defensiva frente a microartrópodos fungívoros, así como podría también atribuírse a ciertas estructuras ornamentadas en otros géneros (p.e. pelos de los peritecios en *Chaetomium*).

**Cabezuelas conidiales.** Thom y Church (1926) observaron dentro del grupo *Aspergillus flavus* una gran variación en relación a las cabezuelas conidiales. En algunas cepas son pequeñas, con pocas cadenas de conidios partiendo de una única fila de fiálides unidas directamente a la vesícula. Otras presentan grandes masas conidiales agrupadas en forma columnar, producidas a partir de fiálides desarrollados a partir de una serie de métulas. *A. flavus* es una especie en la que predominan las cabezuelas con métulas y fiálides, pero algunos aislamientos presentan cierta proporción de cabezuelas que portan solamente fiálides (Pitt & Hocking, 1985). Los resultados del presente trabajo muestran que en el 90% de las cepas estudiadas se observó la presencia de métulas (Tabla 2).

Los resultados para *A. parasiticus* son menos concluyentes, ya que se encontraron cepas con métulas casi en la misma proporción que aquéllas que presentan solo fiálides. Aunque en la bibliografía se describe a esta especie como predominantemente desprovista de métulas, Klich y Pitt (1988) encontraron que la proporción de cepas con esta característica es variable según el medio de cultivo. Pitt y Hocking (1985) señalan que algunos aislamientos pueden presentar hasta el 70% de las cabezuelas con métulas. En general, los autores concuerdan en que la presencia o ausencia de métulas no es una característica distintiva entre estas dos especies.

**Conidios.** Los diámetros de los conidios en las cepas estudiadas se encontraron dentro de los rangos señalados en la bibliografía. Los conidios de *A. flavus* son más pequeños en promedio (3,5-5 µm) que los de *A. parasiticus* (4-6 µm). Una característica importante es la rugosidad de los conidios. *A. parasiticus* presenta casi sin excepción conidios prominentemente equinulados, en tanto que los conidios de *A. flavus*, además de ser más pequeños, son prácticamente lisos o, sólo ocasionalmente, delicadamente rugosos. En las cepas estudiadas en este trabajo, el 94% de las clasificadas como *A. flavus* presentan conidios lisos, en tanto que la totalidad de los conidios de *A. parasiticus* son notoriamente rugosos (Tabla 2), estableciendo una clara diferencia entre ambas especies.

**Micotoxinas.** Siete de las nueve cepas identificadas como *A. parasiticus* resultaron toxicogénicas y todas ellas produjeron aflatoxinas de tipo B y G (Tabla 2). En la especie *A. flavus* se observa una mayor proporción de cepas no toxicogénicas (31%). Si bien la mayoría de las cepas produce aflatoxinas de tipo B (especialmente B<sub>1</sub>), hay una cierta proporción (17%) que produce también aflatoxina G<sub>1</sub>. Es-

Tabla 3.— Producción de aflatoxinas en maní por algunos de los aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus*

Cepa	Cantidad de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				Especie
	B1	B2	G1	G2	
NRRL 2999*	3200	220	835	35	<i>A. parasiticus</i>
M3-1	3840	200	501	35	<i>A. parasiticus</i>
M10	5540	564	1010	384	<i>A. parasiticus</i>
M14-1	3734	500	-	-	<i>A. flavus</i>
M25-1	288	20	63	-	<i>A. parasiticus</i>
M29-1	224	-	-	-	<i>A. flavus</i>
M32-4	272	-	175	-	<i>A. flavus</i>

(\*) Cepa de colección, potente productora de aflatoxinas. Las restantes están conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, F.C.E.N, U.B.A.

(-) Toxina no detectada

tos resultados coinciden con los informados por Klich y Pitt (1988) en su estudio sobre 156 cepas procedentes de colecciones de diversos países.

Si bien el método empleado para determinar la capacidad toxicogénica proporciona resultados cualitativos, algunas de las cepas estudiadas parecían ser productoras muy potentes de las toxinas (Tabla 2) a juzgar por la intensidad de la fluorescencia de las manchas al observar visualmente la placa a la luz U. V. Un grupo de esas cepas fue cultivado en maní y se determinó la cantidad de aflatoxinas producidas al cabo de 7 días. Con fines comparativos se incluyó en esta parte del estudio la cepa de *A. parasiticus* NRRL 2999\*, caracterizada por ser una productora muy estable de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Mehan *et al.*, 1991). Los resultados se presentan en la Tabla 3. Entre los *A. flavus* aislados en el presente estudio, la cepa M14-1 se destaca por ser potente productora de toxinas de tipo B. Los otros aislamientos de *A. flavus* producen las toxinas en menor cantidad. La cepa M25-1 es un *A. parasiticus* débilmente productor sobre este sustrato, en comparación con los aislamientos de esta especie. La cepa M10 es una productora muy potente de las cuatro aflatoxinas.

Es necesario señalar que la cepa de colección (NRRL 2999), con numerosos cultivos *in vitro*, no se encuentra en idénticas condiciones que el resto de las cepas recientemente aisladas del sustrato natural. Los datos presentados en la Tabla 3 permiten inferir que los aislamientos autóctonos difieren en su potencial aflatoxicogénico.

## CONCLUSIONES

Las especies *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se encuentran ampliamente distribuidas en las dife-

rentes localidades productoras de maní de la provincia de Córdoba. Fue relativamente fácil aislar de las muestras recibidas numerosas cepas con características morfológicas y micotoxicológicas bien diferenciadas. Podemos concluir, coincidiendo con Wicklow (1983) en sus estudios sobre cepas aisladas de maíz, que *A. flavus* y *A. parasiticus* son dos especies perfectamente diferenciables.

Klich y Pitt (1988) seleccionaron como criterio más útil para la diferenciación la textura de la pared conidial. Nuestros resultados coinciden con los de estos autores ya que todas las cepas de *A. parasiticus* presentan conidios decididamente rugosos, en tanto que la casi totalidad de las cepas de *A. flavus* presentan conidios lisos o con rugosidades muy finas. Este carácter, junto con el color de las colonias (que se puede diferenciar mejor en APD que en ACY a los 14 días de incubación), permitió que cada aislamiento fuera fácilmente reconocible como *A. flavus* o *A. parasiticus*.

En relación a la diferenciación de *A. oryzae*, *A. sojae* o *A. tamarrii*, todas ellas pertenecientes al grupo de los *Aspergillus* «verde amarillentos» y que podrían, en ocasiones, confundirse con las especies productoras de aflatoxinas, Klich y Pitt (1988) proponen una clave que podría resultar útil por su simplicidad.

La producción de aflatoxinas, si bien no puede ser considerada como criterio taxonómico, dado que no todas las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* las producen, puede sin embargo servir como criterio orientativo o complementario. Por lo general, *A. flavus* produce aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. Por su parte, casi todas las cepas de *A. parasiticus* son toxicogénicas y producen aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

La habilidad de las cepas para producir aflatoxinas es una característica muy importante en relación a la selección de cepas autóctonas para ser empleadas en los estudios de resistencia varietal.

\* Northern Regional Research Laboratory USA.

Tal como se ha señalado, no todas las cepas tienen la misma capacidad toxicogénica y la interacción entre la cepa y el genotipo del huésped puede influir en el nivel de contaminación.

Las cepas aisladas y caracterizadas en el presente estudio, algunas de las cuales resultaron ser potentes productoras de aflatoxinas, están siendo actualmente evaluadas respecto de su capacidad colonizadora sobre diferentes genotipos de maní.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por la financiación parcial de este trabajo. Los autores agradecen al Ing. Agrón. N. Lorenzo, de la Estación Experimental Regional Agropecuaria de Manfredi (INTA), la recolección y el envío de las muestras, así como su colaboración e interés en este trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. 970.45, pág. 1190.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) 1989. «Mycotoxins Economic and Health Risks». Report N° 116, págs. 38-39.
- CHRISTENSEN, M. 1981. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* 73: 1056-1084.
- DAVIS, N. D. & DIENER, U. L. 1983. Some characteristics of toxicogenic and nontoxicogenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In: *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*, Alabama Agricultural Experiment Station, Southern Cooperative Series Bulletin 279, págs. 1-5.
- FILTENBORG, O. & FRISVAD, J. C. 1980. A simple screening method for toxicogenic moulds in pure cultures. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie* 13: 128-130.
- GONZALEZ, H. H. L., RESNIK, S. L. & VAAMONDE, G. 1987. Influence of inoculum size on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *Int. J. Food Microbiol* 4: 111-117.
- KING, A. D., PITT, J. I., BEUCHAT, L. R. & CORRY, J. E. L. 1986. *Methods for the mycological examination of food*. Plenum Press, New York, págs. 40-45.
- KLICH, M. A. & PITT, J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 99-108.
- LACEY, J. 1986. Factors affecting mycotoxin production. In: Steyn, P. S. and R. Vleggaar (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier Science Publishers B.v., Amsterdam, p. 58.
- MAERS, A. & PAUL, M. R. (1930). *A Dictionary of Color*, First Edition, McGraw Hill Book Company, Inc. 207 p.p.
- MEHAN, V. K., MCDONALD, D. & GIBBONS, R. W. 1982. Seed colonization and aflatoxin production in groundnut genotypes inoculated with different strains of *Aspergillus flavus*. *Oleagineaux* 37: 185-189.
- MCDONALD, D., HARAVU, L. J. & JAYANTHI, S. 1991. *The groundnut aflatoxin problems. Review and Literature Database*. ICRISAT (Ed.), Patancheru, 502324 India, págs. 63 y 281.
- MIXON, A. C. & ROGERS, K. M. 1973. Peanut accessions resistant to seed infection by *Aspergillus flavus*. *Agron. J.* 65: 560-562.
- MURAKAMI, H. 1971. Classification of the koji mold. *J. Gen. Appl. Microbio.* 17: 281-309.
- PITT, J. I. 1992. Collaborative study on media for detection and differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and the detection of aflatoxin production. In: *Modern Methods in Food Mycology*, Samsom, R. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I. and King, A. D. (eds.), *Developments in Food Science* 31, Elsevier, The Netherlands, págs. 303-308.
- & HOCKING, A. D. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press, Sydney, Australia, págs. 259-311.
- HOCKING, A. D. & GLENN, D. R. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 110-114.
- RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. 1965. *The Genus Aspergillus*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, págs. 357-404.
- SARGEANT, K., SHERIDAN, A., O'KELLY, J. & CARNAGHAN, R. B. A. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 193: 1096-1097.
- SHOTWELL, O. L., HESSELTINE, C. W., STUBBLEFIELD, R. D. & SORENSON, W. G. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428.
- SMITH, J. E. & MOSS, M. O. 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*. John Wiley & Sons, Ed., págs. 133-140.
- THOM, C. & CHURCH, M. B. 1926. *The Aspergilli*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 272 p.p.
- WIDSTROM, N. W. & ZUBER, M. S. 1983. Prevention and control of aflatoxin in corn. Sources and mechanisms of genetic control in the plant. In: *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*, Alabama Agricultural Experiment Station, Southern Cooperative Series Bulletin 279, págs. 72-76.
- WICKLOW, D. T. 1983. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In: *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*, Alabama Agricultural Experiment Station, Southern Cooperative Series Bulletin 279, págs. 6-12.