

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



***CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
MOHOS AFLATOXIGÉNICOS***

**Trabajo de Grado de Maestría presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por la Lic. Legna D.
Rojas G., para optar al título de Magister Scientiarum
Mención Ciencia y Tecnología de Alimentos
Tutor: Dr. Domenico Pavone**

**Caracas – Venezuela
Septiembre del 2017**



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por: **Legna Desiree Rojas González** Cédula de identidad N° 16.801.887, bajo el título "**Caracterización fisiológica y molecular de Mohos aflatoxigénicos**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **MAGÍSTER SCIENTIARUM, MENCIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 27 de Septiembre de 2017 a las 8:00 AM., para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el salón de usos múltiples del Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **aprobarlo**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte novedoso a la identificación de hongos aflatoxigénicos mediante la aplicación de técnicas moleculares, como complemento a las técnicas convencionales de identificación de mohos.

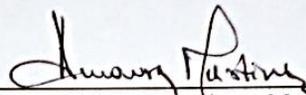
AA

B

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 27 días del mes de Septiembre del año 2017, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado Doménico Pavone.



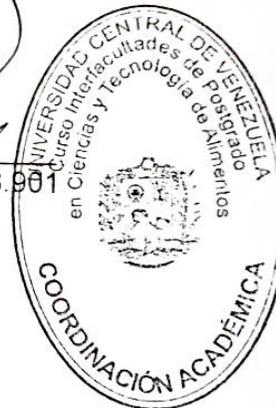
Dr. Blas Dorta
C.I. 6.160.230
IBE - Facultad de Ciencias-UCV



M.Sc. Amaury Martinez
C.I.3.500.600
ICTA - Facultad de Ciencias-UCV



Dr. Doménico Pavone C.I. 11.638.901
Universidad de Carabobo



o.a.s.27/09/2017

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidas por un gran número de especies de *Aspergillus*. Con el fin de realizar la caracterización fisiológica y molecular de mohos aflatoxigénicos se procedió a efectuar una identificación molecular de los aislados mediante la extracción de ADN y amplificación de las regiones ITS del rDNA y con el microsatélite M13. Para la caracterización Fisiológica se evaluó efecto de la Aflatoxina sobre la actividad amilasa procedente de *Trichoderma* TV190. Se logró identificar las cepas de *Aspergillus* a nivel taxonómico de especie, usando las secuencias ITS1. De las 17 cepas evaluadas e inicialmente identificadas como *A. flavus* por métodos convencionales, se logró distinguir entre especies de *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parvisclerotigenus* y *A. oryzae*. Casi el 70% de las cepas catalogadas como productores de aflatoxinas por TLC, fueron identificadas como especies toxigénicas del género *Aspergillus* con base en los análisis moleculares. Mientras que para las cepas no toxigénicas, el 80% de las cepas identificadas como no toxigénicas mediante TLC, fueron identificadas como *A. oryzae* (no toxigénica). En este sentido, la utilización de secuencias ITS no parece ser contundente en la diferenciación de cepas toxigénicas y no toxigénicas. Asimismo, la aplicación de microsatélite M13 no evidenció una clara identificación de las cepas toxigénicas. La determinación de la actividad amilasa indicó una inhibición enzimática en sobrenadantes de los cultivos con cepas toxigénicas, estos resultados sugieren su posible utilización como una herramienta para la identificación de cepas productoras de micotoxinas, al comparar estos tratamientos con un control sin micotoxinas. Finalmente, se evidenció la necesidad de complementar la identificación morfológica con estudios fisiológicos y moleculares para poder realizar una correcta identificación de cepas toxigénicas.

Palabras Clave: *Aspergillus*; Identificación fisiológica y Molecular; aflatoxina.

Physiological and Molecular Characterization of Aflatoxigenic Molds.

ABSTRACT

Aflatoxins are secondary metabolites produced by a large number of *Aspergillus* species. In order to perform the physiological and molecular characterization of aflatoxigenic molds, a molecular identification of the isolates was carried out by DNA extraction and amplification of the ITS regions of the rDNA and M13 microsatellite. For the Physiological characterization, the effect of Aflatoxin on amylase activity from *Trichoderma* TV190 was evaluated. *Aspergillus* strains were identified at the taxonomic level of species, using the ITS1 sequences. Of the 17 strains evaluated and initially identified as *A. flavus* by conventional methods, it was possible to distinguish between *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parvisclerotigenus* and *A. oryzae*. Almost 70% of the strains classified as aflatoxin producers by TLC were identified as toxigenic species of the *Aspergillus* genus based on molecular analyzes. While for non-toxigenic strains, 80% of strains identified as non-toxigenic by TLC were identified as *A. oryzae* (non-toxigenic). In this sense, the use of ITS sequences does not appear to be conclusive in the differentiation of toxigenic and non-toxigenic strains. Also, the application of M13 microsatellite did not show a clear identification of the toxigenic strains. The determination of the amylase activity indicated an enzymatic inhibition in supernatants of the cultures with toxigenic strains, these results suggest its possible use as a tool for the identification of strains producing mycotoxins, when comparing these treatments with a control without mycotoxins. Finally, the need to complement morphological identification with physiological and molecular studies was demonstrated to be able to correctly identify toxigenic strains.

Key Words: *Aspergillus*; Physiological and Molecular Identification; aflatoxin.

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	10
1.1.- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
1.1.1.- OBJETIVO GENERAL.....	11
1.1.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2.- BASES TEÓRICAS.....	12
2.1.- MOHOS AFLATOXIGÉNICOS EN LA INDUSTRIA AGRÍCOLA.....	12
2.2. - IDENTIFICACIÓN DE MOHOS AFLATOXIGÉNICOS.....	13
2.2.1. - MÉTODO CONVENCIONAL.....	13
2.2.1.1. – MORFOLOGIA.....	13
2.2.1.2.- CULTIVOS.....	15
2.2.1.3.- DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS.....	16
2.2.1.3.1.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	16
2.2.1.3.2.- MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	17
2.2.1.3.2.1- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.....	18
2.2.1.3.2.2- FISIOLÓGICOS.....	18
2.2.2.- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	19
2.2.2.1- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	19
2.2.2.2.- SECUENCIACIÓN.....	22
2.2.2.3.- DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGENICOS POR PCR.....	23
2.2.2.3.1- Genes universales en la detección de mohos aflatoxigénicos.....	23
2.2.2.3.2.- GENES DE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE AFLATOXINAS.....	26
2.2.2.3.3.- GENES DE EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGENICOS POR PCR.....	29
2.2.2.3.3.1.- GEN REGULADOR DE LA AFLATOXINA (<i>aflR</i>).....	29
2.2.2.3.3.2.- GENES DE LA VERSICOLORINA (VER 1 Y VER A), O- METILTRANSFERASA A (OMT-1 O OMT A) Y O-METILTRANSFERASA B (OMT B).....	30
2.2.2.3.3.3.-GEN DE LA ÁCIDO NORSOLORINICO REDUCTASA (NOR 1 O AFLD).....	31
2.2.2.3.3.4.- DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGÉNICOS USANDO	

VARIOS GENES.....	32
2.2.3.3.3.- MICROSATÉLITES.....	34
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1.- CEPAS.....	35
3.2.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE LAS CEPAS..	35
3.3.- CULTIVOS MONOSPÓRICOS.....	35
3.4.- Identificación de las cepas a nivl taxonómico de especie.....	36
3.5.- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	36
3.5.1.- EXTRACCIÓN DE ADN.....	36
3.5.2.- Amplificación de las regiones ITS del rDNA y con el microsatélite M13.....	36
3.5.3.- Secuenciación de los productos de PCR de las regiones ITS.....	37
3.5.4.- Análisis de secuencias.....	37
3.6.- IDENTIFICACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS TOXIGENICAS.....	38
3.6.1.- Obtención de la enzima amilasa de <i>Trichoderma</i> TV190.....	38
3.6.2.- Obtención de los extractos de cepa de <i>A. flavus</i> toxigénicos y no toxigénicos.....	38
3.6.3.- Evaluación del efecto de la Aflatoxina sobre la actividad amilasa procedente de <i>Trichoderma</i> TV190.....	38
3.6.4.- Determinación de la Glucosa en los extractos de cepas de <i>A. flavus</i> toxigénicos y no toxigénicos.....	39
3.6.5.- Análisis estadístico de la actividad amilasa.....	39
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1.- Capacidad de producción de aflatoxinas por TLC.....	40
4.2.- Identificación de las cepas de <i>A. flavus</i>	41
4.3.- Análisis de restricción de las regiones ITS.....	55
4.4.- Análisis filogenético de las secuencias ITS.....	57
4.5.- Variabilidad genética con el iniciador para microsatélites M13.....	61
4.6.- Inhibición de la actividad amilasa por cepas toxigénicas de <i>Aspergillus</i>	64
5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
6.- REFERENCIAS.....	70
7.- APENDICE.....	77

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. A. Conidióforos de <i>Aspergillus</i> spp.; B. <i>Aspergillus flavus</i> ; C. <i>Aspergillus niger</i>	14
FIGURA 2. Cepa no aflatoxigénica (a, b) y cepa aflatoxigénica (b, c) de <i>A. niger</i> visualizado con luz visible (a, b) y a 365 nm de luz UV (c, d). El borde del anillo blanco alrededor de la colonia de la cepa aflatoxigénica muestra fluorescencia azul débil.....	16
FIGURA 3. Uso de la Reacción en cadena de la Polimerasa para la detección de mohos micotoxigénicos	20
FIGURA 4. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	21
FIGURA 5. Método de Secuenciación de Sanger.....	23
FIGURA 6. Ubicación de las secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2) del ADNr de hongos.....	24
FIGURA 7. Genes de la ruta biosintética de la Aflatoxina en <i>A. flavus</i> . Los antiguos nombres de los genes están ubicados en la parte superior de la línea mientras que los nuevos nombres renombrados se marcan debajo de la línea. Las flechas indican la dirección de transcripción de genes.....	26
FIGURA 8. Esquema de la ruta biosintética de las principales Aflatoxinas.....	29
FIGURA 9. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) los productos de la extracción de ADN genómico de algunas cepas de <i>Aspergillus</i> utilizadas en este estudio (cepas 1 a 9).....	42
FIGURA 10. Electroforesis en gel de agarosa (1,2 %) de los productos de PCR de las regiones ITS1 5,8S e ITS2.....	43
FIGURA 11. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias de <i>A. flavus</i> obtenidas con el iniciador ITS1.....	58
FIGURA 12. Productos de PCR con el iniciador M13. Carril 1: Patrón de Peso Molecular (Producto de PCR del gen ITS).....	62
FIGURA 13. Actividad amilasa en presencia de sobrenadantes de cultivos con cepas toxigénicas y no toxigénicas de <i>Aspergillus</i>	65

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cepas de <i>A. flavus</i> usadas en este estudio, origen y capacidad de producir aflatoxinas.....	40
TABLA 2. Secuencias obtenidas de las regiones ITS1 5,8S e ITS2 del ADN ribosomal, con el iniciador ITS1 (forward).....	45
TABLA III. Identificación de las la cepas de <i>Aspergillus</i> en estudio, a partir de la comparación de secuencias obtenidas con la base de datos del GenBANK usando el servicio BLAST.....	48
Tabla IV. Número de puntos de corte con varias enzimas de restricción, para las secuencias ITS obtenidas en este estudio.....	55

1.- INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidas por un gran número de especies de *Aspergillus*. De hecho, son considerados como los compuestos más tóxicos, mutagénicos y cancerígenos entre las micotoxinas conocidas (Abdin *et al.*, 2010; Jamali *et al.*, 2013), siendo capaces de generar efectos nocivos sobre la salud humana y animal, así como de numerosas pérdidas económicas. La contaminación de los alimentos por mohos aflatoxigénicos, especialmente en los países tropicales puede ocurrir durante precosecha, procesamiento, transporte y el almacenamiento. Estos mohos infectan principalmente maíz, algodón, cacahuetes, nueces de árbol, higos, especias así como sus productos terminados (Manonmani *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2009). Dado que la salud de los consumidores puede verse afectada por el consumo de aflatoxinas, se disponen de métodos convencionales para la caracterización e identificación de dichos microorganismos así como de las micotoxinas que producen. Tal metodología implica el uso de medios selectivos, seguido del aislamiento e identificación de las características morfológicas por parte de personal experto (Roseanu *et al.*, 2010). Asimismo, la discriminación de las cepas toxigénicas y no toxigénicas requieren del cultivo del moho en medios inductores adecuados con la posterior extracción de toxinas con disolventes orgánicos y el seguimiento de su presencia por cromatografía y técnicas de ELISA (Rashid *et al.*, 2008).

Dichos procedimientos aunque efectivos, suelen ser laboriosos y requieren de varios días, no obstante, en la actualidad se recomienda el llamado enfoque polifásico, basado en la utilización de caracteres morfológicos en combinación con características fisiológicas y moleculares para la identificación de especies (Arrúa *et al.*, 2012). De esta manera, es posible contar no sólo con la metodología convencional sino con métodos de detección e identificación rápidos y efectivos, para la identificación de mohos toxigénicos (Pavón *et al.*, 2008; Abdin *et al.*, 2010). Los métodos moleculares se basan en la detección de las diferencias en las secuencias de ácidos nucleicos (*et al.*, 2010Abdin) y dentro de ellos, se destaca la aplicación de la técnica PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa). La PCR permite la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN diana y específicamente de cebadores que flanquean genes implicados en las rutas biosintéticas de las micotoxinas, resulta innecesario el cultivo de las cepas, al menos no durante mucho tiempo, antes de su

detección. Por otro lado, el ADN diana se puede detectar incluso en una mezcla compleja, no se requieren sondas radioactivas, es rápido, sensible y altamente versátil. Muchos patógenos se han detectado mediante PCR (Manonmani *et al.*, 2005).

Se conoce que los aislados individuales de *A. flavus* varían en su capacidad para producir aflatoxina, tanto *in vitro* como durante la infección de los cultivos, por lo que el diseño de una estrategia de identificación de la contaminación con el hongo es crítica para predecir el riesgo de contaminación potencial de la aflatoxina (Passone *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta lo anterior, resulta necesario realizar la caracterización fisiológica y molecular de mohos aflatoxigénicos.

1.1.- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1.- OBJETIVO GENERAL

Estudiar la factibilidad de detectar la presencia de mohos productores de aflatoxinas mediante métodos fisiológicos y moleculares.

1.1.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar molecularmente cepas de mohos potencialmente toxigénicas a nivel taxonómico de especie, usando las secuencias de los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal.

Determinar la potencialidad de secuencias específicas dentro de los ITS, que puedan diferenciar entre mohos toxigénicos de los no toxigénicos.

Evaluar características fisiológicas para diferenciar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas.

2. - BASES TEÓRICAS

2.1. - MOHOS AFLATOXIGÉNICOS EN LA INDUSTRIA AGRÍCOLA

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios ampliamente conocidos por su alto potencial carcinogénico (Yu, 2012). A escala mundial, la contaminación de alimentos y piensos por aflatoxinas ha sido bien documentada, siendo los cultivos de maíz, maní, algodón entre otros cereales, los contaminados con más frecuencia (El Khoury *et al.*, 2011). Grandes pérdidas económicas son generadas anualmente, pues según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año (Arrúa *et al.*, 2012). Se estima que alrededor de 4,5 millones de personas están en riesgo de exposición crónica a las aflatoxinas de los cultivos de alimentos contaminados, pues el problema no se limita a una región geográfica en particular. Las aflatoxinas se producen tanto en el campo como en el almacenamiento (Filazi y Sereli, 2013).

Las aflatoxinas son producidos principalmente por las especies del género *Aspergillus* sección *flavi*: *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Rodrigues *et al.*, 2009). Entre los 18 tipos diferentes de aflatoxinas identificados, los encontrados predominantemente en cultivos así como en los productos alimenticios son la aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, las cuales se nombran en base a la fluorescencia de color azul (B) o verde (G) con luz ultravioleta, y a su relativa movilidad por cromatografía en capa fina (Yu, 2012). *A. flavus* produce típicamente AFB₁ y AFB₂ es ubicuo, favoreciendo las partes aéreas de las plantas (hojas, flores), mientras que *A. parasiticus* producen AFG₁ y AFG₂ y AFB₁ y AFB₂, está más adaptado a un ambiente del suelo y tiene una distribución más limitada. El nivel de toxicidad aguda y crónica es AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂. Tal como se indicó inicialmente, *A. nomius* también es productor de aflatoxinas, sin embargo, se encuentran con menos frecuencia (Filazi y Sereli, 2013).

Inicialmente, el crecimiento del hongo y el metabolismo primario forman poca o ninguna aflatoxina. Con el tiempo, el fósforo, el nitrógeno y algunos elementos traza son limitados y el crecimiento primario se reduce. Se acumulan varios metabolitos primarios, entre ellos, piruvato, malato, acetato y aminoácidos que provocan el desarrollo y estimulan

e inducen la actividad de las enzimas del metabolismo secundario, por la ruta de la biosíntesis de los poliketidos, que a su vez provoca la biosíntesis de las aflatoxinas sobre la biosíntesis de los ácidos grasos en las cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bogantes *et al.*, 2004).

2.2. - IDENTIFICACIÓN DE MOHOS AFLATOXIGÉNICOS

Desde el punto de vista micológico, hay diferencias cualitativas y cuantitativas en las capacidades toxigénicas de diferentes cepas dentro de cada especie. En este sentido, se presentan una serie de metodologías para controlar la incidencia de la contaminación de aflatoxinas así como para la detección de mohos aflatoxigénicos (Manonmani *et al.*, 2005), las cuales son reportados a continuación.

2.2.1. - MÉTODO CONVENCIONAL

2.2.1.1. - MORFOLOGIA

Los criterios morfológicos utilizados para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos, se basan en la utilización de medios de cultivo diferenciales y temperaturas de incubación que permitan el desarrollo de características útiles en su identificación. Las principales características macro y microscópicas utilizadas en la clasificación a nivel de especie en estos hongos incluyen el diámetro de las colonias; coloración del anverso y reverso de las colonias; presencia de esclerocios, gotas de exudado y pigmento difusible; textura de las colonias, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula; medidas de los estipes, vesículas, métulas y fiálides; ornamentación y color de las conidias, de las células de Hülle y de las ascosporas (**Figura 1**) (Arrúa *et al.*, 2012; Foong-Cunningham *et al.*, 2007).

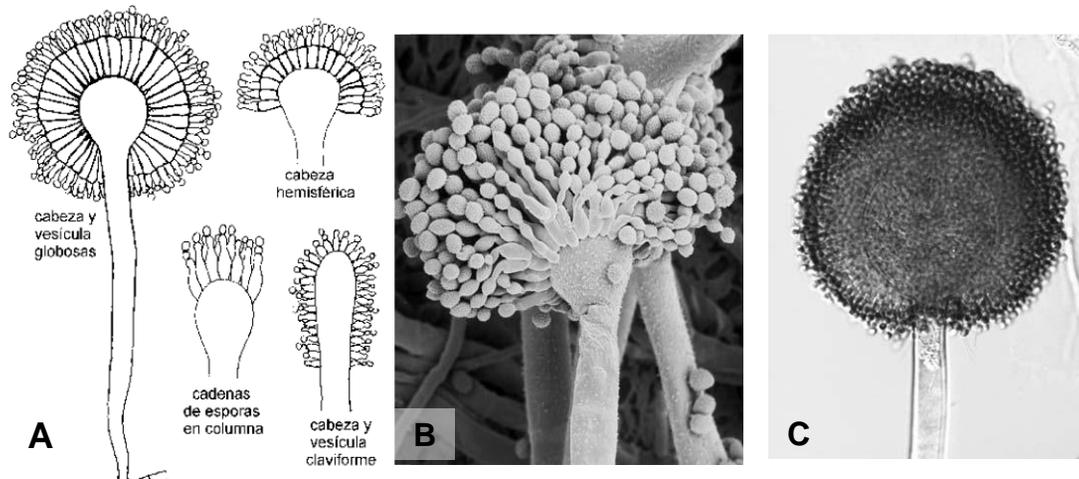


FIGURA 1: A. Conidióforos de *Aspergillus* spp.; B. *Aspergillus flavus*; C. *Aspergillus niger*.
(Fuente: Rendón, 2009; Park *et al.*, 2002)

En este sentido, el color es la principal característica macroscópica para la identificación. Los mohos del género *Aspergillus* poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme. Los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En *Aspergillus* sp. hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. También pueden poseer una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Abarca, 2000).

Otra característica importante dentro de la especie *A. flavus*, relacionada con la capacidad de supervivencia y dispersión del hongo en el ambiente, es la capacidad de producir esclerocios. Dentro de la variación fenotípica encontrada para los aislamientos de esta especie, se han podido establecer dos tipos de cepas. Las denominadas cepas S, son productoras de un alto número de pequeños esclerocios (<400µm de diámetro) y generalmente producen grandes cantidades de aflatoxinas. Estos aislamientos han sido referidos como atípicos y también denominados como *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*. Las cepas L producen esclerocios grandes (> 400 µm de diámetro) en bajo número, y en promedio producen menor concentración de aflatoxinas. (Pildain *et al.*, 2005).

2.2.1.2.- CULTIVOS

La identificación de los hongos aflatoxigénicos puede llevarse a cabo utilizando medios de cultivo especializados para la inducción de aflatoxinas (Midorikawa *et al.*, 2008). Entre los medios más utilizados se encuentran, el agar de diferenciación de *Aspergillus* o *Aspergillus flavus* agar-*parasiticus* (AFPA); el agar de crema de coco (CCA) y el agar Czapek Dox (CZ). El AFPA es un medio para la detección de *A. flavus* y *A. parásiticus*. Con este método es posible distinguir estas especies de otras *Aspergillus* basadas en el desarrollo de color naranja en el reverso de las placas.

Otros medios utilizados son el agar coco, sobre la base de la diferencia en la fluorescencia de las colonias. Sin embargo, otro medio llamado agar Sabouraud conteniendo beta ciclodextrina puede facilitar la detección simultánea y enumeración de *A. flavus* y *A. parasiticus* bajo radiación UV (Barkai-Golán y Paster, 2011). La detección de aflatoxinas por la observación de fluorescencia en las colonias no es fácil en aquellas cepas de *Aspergillus* aflatoxigénicos. Una prueba diagnóstica para detectar la presencia de aflatoxinas en las colonias de hongos es la fosforescencia de las aflatoxinas a temperatura ambiente que dura aproximadamente 0,5 seg después de desconectar la luz UV. Las cepas de *Aspergillus* no aflatoxigénicos no son fluorescentes, mientras que los productores de aflatoxinas emiten dicha fluorescencia (**Figura 2**) (Stark, 2010).

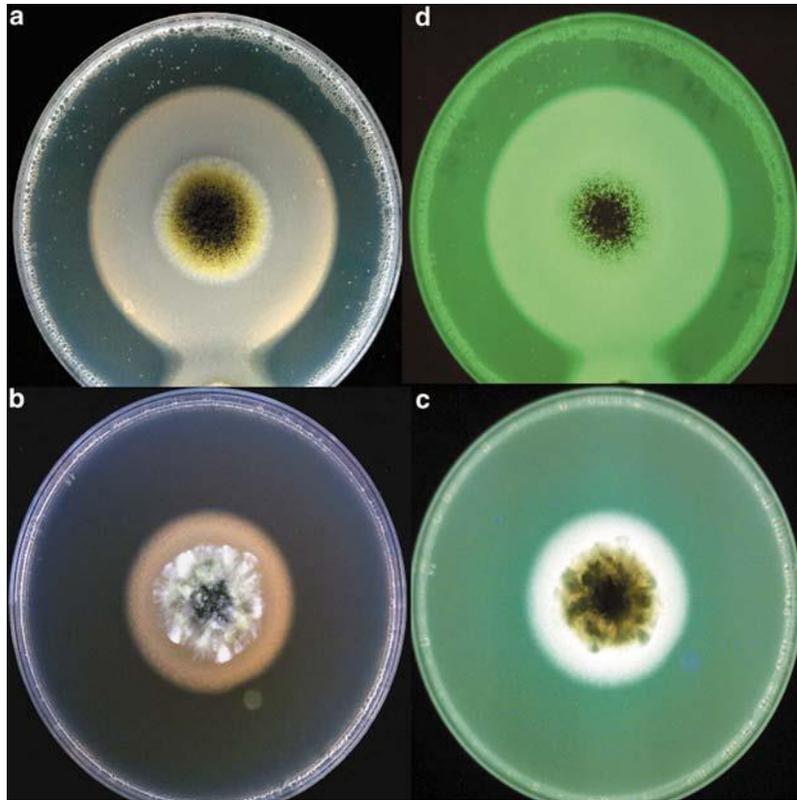


FIGURA 2. Cepa no aflatoxigénica (a, b) y cepa aflatoxigénica (b, c) de *A. niger* visualizado con luz visible (a, b) y a 365 nm de luz UV (c, d). El borde del anillo blanco alrededor de la colonia de la cepa aflatoxigénica muestra fluorescencia azul débil (Fuente: Stark, 2010).

2.2.1.3.- DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS

2.2.1.3.1.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía en capa fina (TLC) es un método usado ampliamente para mediciones cuantitativas y semi-cuantitativas de micotoxinas. La aplicación de la TLC basada en sílica gel se ha reportado para la detección de micotoxinas comunes (aflatoxinas, citrinina, fumonisina). A pesar de que su costo es menor y es simple, la falta de automatización ha llevado a la TLC a ser reemplazada por otras técnicas. Dentro de ellas, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Roseanu *et al.*, 2010).

En relación a la GC, dicha técnica es aplicable a los compuestos que son volátiles y termoestables. La detección se consigue conectando el sistema a la técnica de espectrometría de masas (MS), ionización por llama o espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. La mayoría de las micotoxinas no son volátiles y por lo tanto necesitan ser derivatizadas por reacciones químicas tales como la silylación o polifluoroacilación con el fin de ser cuantificado. No obstante, debido a su limitación a los compuestos volátiles y termoestables, la GC no es una técnica adecuada para fines comerciales (Barkai-Golan y Paster, 2011).

Finalmente, la HPLC es ampliamente aceptada como método oficial para la determinación de las toxinas. Se aplica en conjunto con la detección por UV, fluorescencia, amperométrica o espectrofluorimétrico. Tanto la HPLC normal así como la de fase inversa se utiliza para la separación y purificación de micotoxinas. Como herramienta analítica, la HPLC ofrece la ventaja de una alta resolución, límite de detección, con la posibilidad de ser acoplado a múltiples sistemas de detección automatizados. Aunque precisa y específica, la mayor parte de los ensayos cromatográficos son costosos, consume mucho tiempo y requieren de un costoso equipamiento y procedimientos limpieza (Roseanu *et al.*, 2010).

2.2.1.3.2.- MÉTODOS BIOLÓGICOS

Los biosensores han surgido como un método rápido, sensible, práctico y conveniente para el análisis de micotoxinas. Se componen de un elemento de reconocimiento, comúnmente de origen biológico, que produce una respuesta cuantificable en un elemento de transducción de la señal cuando está en contacto con el analito diana. La mayoría de los mecanismos de transducción de señales son ópticos (colorimétrico, fluorescencia, quimioluminiscencia potenciada) y electroquímicos. En comparación con otras técnicas analíticas tradicionales, los biosensores ofrecen la posibilidad de controlar un gran número de muestras y por lo tanto, una herramienta muy práctica que también se puede automatizar para la detección de toxinas en análisis de rutina (Roseanu *et al.*, 2010).

2.2.1.3.2.1- INMUNOLÓGICOS

Estos son ensayos de unión basados en la aplicación de anticuerpos monoclonales o policlonales generados contra las toxinas (antígenos), los cuales se pueden analizar por columnas de inmunoafinidad (IAC) o ligado a enzimas (ELISA). El principio de la prueba ELISA es la reacción antígeno-anticuerpo. En la actualidad se encuentran disponibles kits comerciales para la detección de micotoxinas (Foong-Cunningham *et al.*, 2007).

2.2.1.3.2.2- FISIOLÓGICOS

Los métodos fisiológicos se basan en la utilización de métodos enzimáticos para la detección rápida y simple de contaminantes ambientales tales como pesticidas, metales pesados, etc. En el caso de las aflatoxinas, se ha tratado de determinar enzimas que metabolizan la aflatoxina en un compuesto detectable o una enzima que puede ser inhibida por la toxina (Arduini *et al.*, 2007). En el primer caso, es decir, si la enzima metaboliza el analito, se puede determinar el analito midiendo el producto enzimático; mientras que si el analito inhibe la enzima, la disminución de la formación del producto enzimático puede medirse y correlacionarse con la concentración del analito. En este último caso, este tipo de biosensor se denomina "biosensor basado en la inhibición enzimática" (Arduini *et al.*, 2010).

Uno de los métodos más utilizados se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa por la aflatoxina. Dado que se ha demostrado los efectos dañinos de la aflatoxinas sobre los sistemas gastrointestinal, respiratorio, cardiovascular y nervioso central de los seres humanos y animales. En particular, la aflatoxina inhibe la acetilcolinesterasa, una enzima clave en la transmisión de los impulsos nerviosos. Sobre la base de este efecto, se desarrolló un método para cuantificar AFB1 midiendo la disminución en la actividad enzimática, determinada usando el método espectrofotométrico de Ellman, después de la exposición de la enzima a AFB1 (Moscone *et al.*, 2011).

En este sentido, la inhibición enzimática por la aflatoxina ha sido evaluada, no obstante, la mayoría de los estudios se enfocan en el efecto adverso de las aflatoxinas sobre

animales de experimentación, destacándose aquellas enzimas que participan en actividades metabólicas del hígado (Parmar *et al.*, 2016). Siendo necesaria la implementación de bioensayos empleando enzimas de fuentes diferentes como método indirecto para la detección de aflatoxinas.

2.2.2.- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identificación morfológica de los hongos filamentosos presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, la observación de estructuras características sólo se consigue si el hongo es cultivado en determinadas condiciones y, a veces, es necesario conseguir que el microorganismo se reproduzca sexualmente. Además es un proceso lento que necesita de expertos entrenados y requieren de varios días o semanas (Rodríguez *et al.*, 2008). De esta manera, la utilización de los métodos moleculares son una alternativa para una rápida y efectiva detección e identificación (Pavón *et al.*, 2008; Abdin *et al.*, 2010), entre ellos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar contaminaciones recientes o pasadas de mohos toxigénicos antes o después del procesamiento de materias agrícolas (Patiño *et al.*, 2007; Greiner y Konietzny, 2008).

2.2.2.1- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1983, Kary Mullis desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN: la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés), es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este, es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial, a través de repetidos ciclos de amplificación de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN Polimerasa termoestable. Así, se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Lipp *et al.*, 2005). La PCR es una técnica altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades muy pequeñas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil

identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención (Borem *et al.*, 2003).

En este sentido, la PCR hace uso de cebadores que flanquean genes implicados en las rutas biosintéticas de las micotoxinas, por lo tanto, constituye un sistema de detección exacto, sensible y específico capaz de detectar una contaminación reciente o pasada de mohos toxigénicos antes o después del procesamiento de materias agrícolas (Patiño *et al.*, 2007; Greiner y Konietzny, 2008) (**Figura 3**).

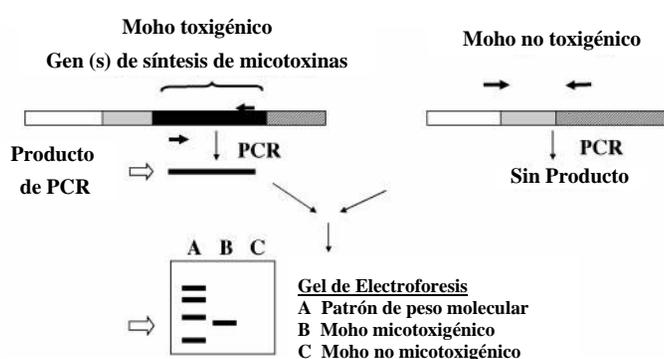


FIGURA 3. Uso de la Reacción en cadena de la Polimerasa para la detección de mohos micotoxigénicos (Fuente: Edwards *et al.*, 2002).

De acuerdo con Corvalán *et al.*, (2002), cada ciclo de amplificación consta de tres etapas.: la desnaturalización, el alineamiento y la extensión (**Figura 4**). En la desnaturalización, el ADN del organismo blanco se desnaturaliza debido a que la muestra es sometida a una temperatura de 95°C, logrando la separación de las hebras constituyentes del ADN, las cuales servirán cada una como molde o templado para la síntesis de una nueva molécula de ADN. El tiempo de desnaturalización depende de la longitud del templado, y debido a que al comienzo de la amplificación es necesario separar todo el ADN de la muestra analizada, generalmente se realiza una incubación de 5 minutos a 95°C.

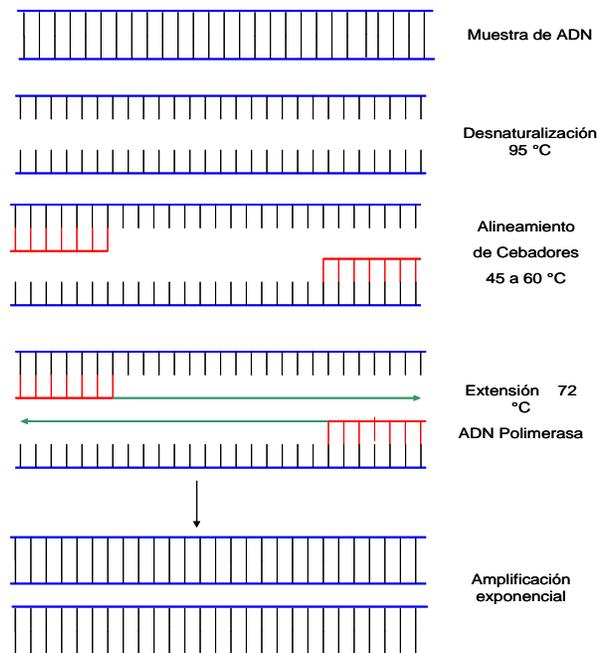


FIGURA 4. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). (Fuente: Modificado de Corvalán *et al.*, 2002).

A continuación, le sigue la etapa de alineamiento, la cual consiste en que el ADN templado y los cebadores se alinean o hibridan debido a la presencia de secuencias complementarias en cadenas del ADN y los cebadores. La reacción se lleva a cabo entre los 45 °C y 60 °C, y el ADN de doble cadena formado, definirá el sitio de acción de la ADN Polimerasa.

Por último, se lleva a cabo la extensión, etapa en la cual la DNA polimerasa extiende los cebadores en dirección 5'→ 3'. La extensión ocurre a 72 °C que es la temperatura de máxima eficiencia de la enzima y el tiempo de la extensión dependerá de la distancia de los cebadores entre sí. Debido a que se utilizan dos cebadores en la reacción, uno para cada hebra, el segmento definido será amplificado en forma exponencial. Esto significa que en cada ciclo de amplificación se producirá un número de copias equivalente al exponente del número de hebras de ADN templado.

2.2.2.2.- SECUENCIACIÓN

Con la finalidad de conocer el nivel de variación del ADN (Nuclear o extranuclear) de un gen o conjunto de genes de un organismo determinado, se selecciona un segmento particular del genoma cuya tasa de mutación sea apropiada para estudios a escala individual, poblacional o específica. Una vez seleccionado el segmento de ADN apropiado, este se separa mediante una amplificación enzimática para su posterior secuenciación por alguno de los métodos disponibles, el químico (Maxam y Gilbert) o el enzimático (Sanger) (Cooper y Hausman, 2002).

El método químico de secuenciación se basa en la ruptura en un nucleótido específico del ADN por sustancias químicas. En este método, las cadenas de ADN se marcan en una sola terminación (la 5' o la 3') con un compuesto fluorescente, quimioluminiscente o radioactivo. Sólo una de las cadenas marcadas se separa mediante una digestión con enzimas de restricción o por desnaturalización. La solución que contiene estas cadenas marcadas se divide y se someten a 4 tratamientos químicos con dimetilsulfato, ácido fórmico, hidrazina+ NaCl. Estos compuestos químicos empleados por separado metilan, protonan o sustituyen por su isómero a un nucleótido específico dentro de la cadena en cada reacción. Se agrega piperidina a los cuatro tratamientos químicos y entonces la cadena de ADN se rompe en los sitios donde se encuentra el nucleótido modificado. El tratamiento con dimetilsulfato origina fragmentos cuyo nucleótido terminal es guanina. En cambio, la reacción con el ácido fórmico corta la cadena en las adeninas y guaninas, mientras que la hidrazina lo hace en las timinas y las citosinas. Finalmente, los fragmentos generados en cada una de estas cuatro muestras se someten a una electroforesis para separarlos por su tamaño (González, 1998).

El método enzimático se basa en la síntesis *in vitro* de una de las cadenas de ADN con una polimerasa. La síntesis se inicia en el sitio donde un cebador se encuentra unido a la cadena de ADN. Se incorpora una marca radioactiva, quimioluminiscente o fluorescente a la cadena durante la síntesis o previamente al cebador. La reacción de esta síntesis termina cuando la polimerasa incorpora un nucleótido análogo a (2',3'- dideoxynucleótido 5'- trifosfatos, [ddNTP's]) pero sólo uno de los cuatro ddNTP's carecen del grupo 3'- OH que es necesario para que la polimerasa catalice la incorporación de otro nucleótido. La síntesis se lleva a cabo en cuatro reacciones por separado, cada una de las cuales contiene

los cuatro nucleótidos regulares (2',3'- desoxinucleótido5'- trifosfatos, [dNTP's]) pero sólo uno de los cuatro ddNTP's. Por último, los fragmentos generados en cada una de las cuatro reacciones se someten a una electroforesis para separarlos de acuerdo a su tamaño (**Figura 5**).

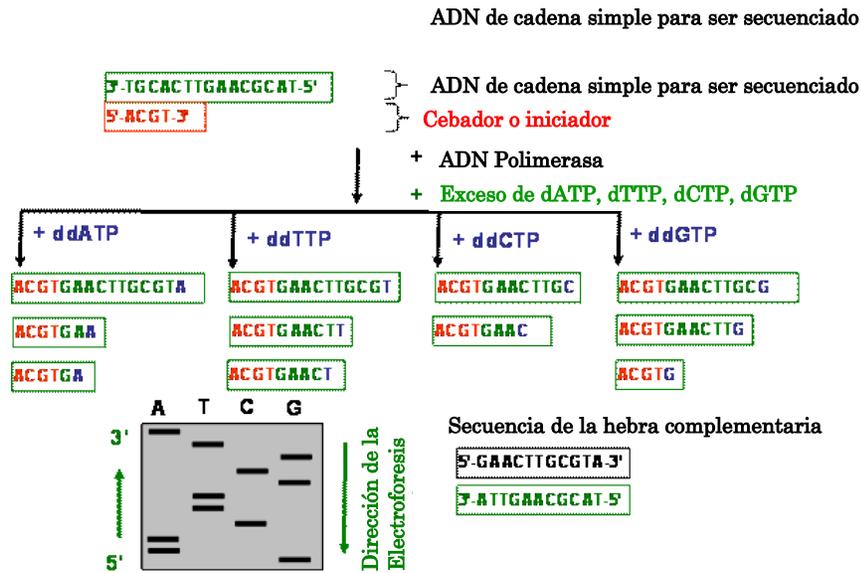


FIGURA 5. Método de Secuenciación de Sanger. (Fuente: Modificado de Cooper y Hausman, 2002).

La secuenciación enzimática es actualmente la más usada, mientras que la secuenciación de ADN a gran escala se realiza frecuentemente con sistemas automatizados, que utilizan cebadores fluorescentes en reacciones de secuenciación con dideoxinucleótidos. Las hebras de ADN sintetizadas se someten a electroforesis y se van pasando través de un haz de láser que excita el marcador fluorescente. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador, y un ordenador recoge y analiza los datos (Cooper y Hausman, 2002).

2.2.2.3.- DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGENICOS POR PCR.

2.2.2.3.1- GENES UNIVERSALES EN LA DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGENICOS.

Tal como se indicó en segmentos anteriores, la técnica de PCR constituye una alternativa a los ensayos tradicionales para la identificación fúngica (Paterson, 2006), por lo que la base para el desarrollo de ensayos de PCR en la detección de especies con alto potencial para producir micotoxinas, se ha enfocado en el uso de cebadores "universales", los cuales permiten aislar regiones específicas de ADN que luego son comparados con secuencias de especies blanco disponibles en las bases de datos. De estos cebadores, los genes 18S 5,8 S y 28S del ADN ribosomal (ADNr), el ADN mitocondrial, la región espaciadora intergénica y las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) han sido utilizados para la detección de *Aspergillus* (Henry *et al.*, 2000; Abdin *et al.*, 2010; Godet y Munaut, 2010). Es importante destacar que entre dichas regiones codificantes del ADNr se encuentran las secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2). Las regiones ITS se encuentran específicamente entre los genes 18S y 28S (**Figura 6**) y ofrecen distintas ventajas sobre otras dianas moleculares, incluyendo el aumento de la sensibilidad debido a la existencia de aproximadamente 100 copias por genoma (Henry *et al.*, 2000).

La utilización de las regiones ITS1 e ITS2 se basa en que las secuencias del ADN ribosomal (rADN) de la unidad pequeña evolucionan de una forma relativamente lenta y son útiles para el estudio de organismos poco relacionados. La región espaciadora transcrita interna y los espaciadores intergénicos del rADN nuclear evolucionaron más rápido y pueden variar incluso entre especies dentro de un género o entre poblaciones (White *et al.*, 1990).

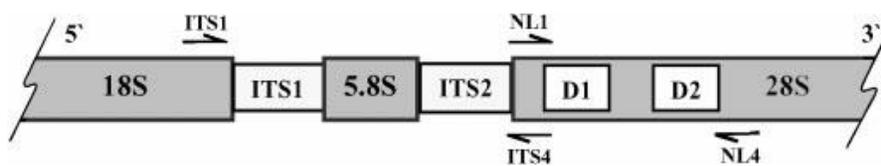


FIGURA 6. Ubicación de las secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2) del ADNr de hongos. (Fuente: Edwards *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que las regiones ITS pueden ser amplificadas a partir de un moho de interés y posteriormente ser secuenciado para identificar regiones de ADN única para dicho moho. Los polimorfismos dentro de la región ITS son generalmente (pero no siempre) a nivel de especie, en vez de entre aislados de la misma especie, por lo que es

un blanco ideal para el desarrollo de ensayos de PCR específicos para la identificación a nivel taxonómico de especie. Las regiones más altamente conservadas dentro de las ITS son también adecuadas para el diseño de cebadores para diferenciar un género de otro (Magan y Olsen, 2004).

Algunos de los trabajos destacados en el empleo de cebadores ITS se encuentran los de Bu *et al.*, (2005) quienes desarrollaron un ensayo para la identificación y cuantificación de *A. flavus* implicados en las infecciones humanas. El sistema permitió la discriminación de la especie al amplificar una secuencia de 199 pb de la región del espaciador transcrito interno ITS1 y el rRNA 5,8S. La sensibilidad del ensayo para *A. flavus* fue de 0,1 pg de ADN genómico.

Asimismo, Cruz y Büttner (2008) desarrollaron un ensayo de PCR en tiempo real para *A. flavus* empleando cebadores derivados de las regiones 5,8S y 28S del ADNr. Los cebadores no amplifican ADN extraído de otras 39 especies de hongos derivados de 15 géneros. Mientras que Sardiñas *et al.*, (2011) desarrollaron ensayos para la detección y cuantificación de *A. flavus* y *A. parasiticus* utilizando cebadores del ITS2 del ADNr. Los ensayos lograron la cuantificación de esporas de ambas especies en muestras de harina de trigo artificialmente contaminadas. El nivel de detección fue de 10^6 esporas/g de harina de trigo sin previa incubación. La incubación durante 16 h de 1 g de harina con 1 ml de una suspensión de esporas permitió la detección de 10^2 esporas/g.

Aunque se ha reportado que cuando se desea detectar y diferenciar especies estrechamente relacionadas, el polimorfismo en las regiones ITS podrían no ser suficientes para permitir el diseño de cebadores de PCR. Aunque Mateo *et al.*, (2011) destacan que tanto ITS1 y ITS2 son muy variables en el género *Aspergillus* lo cual permite la discriminación entre las especies estrechamente relacionadas, resulta conveniente realizar los ensayos utilizando genes implicados en la ruta biosintética de la aflatoxina.

norsolorinico (NOR). De hecho, dos ácido graso sintasas (*fas-1* y *fas -2*) y una policétido sintasa (*pksA*) están involucrados en la síntesis de la policétido para generar el ácido norsolorinico. Adicionalmente, análisis enzimáticos y de secuenciación indican que el gen *hypC* (gen ubicado en la región intergénica de *pksA* y *nor-1*) se requiere para la síntesis del ácido norsolorinico. Es importante comentar que los genes *fas-1*, *fas-2* y *pksA* fueron renombrados como *aflA*, *aflB* y *aflC*, respectivamente (Yu y Ehrlich, 2011).

A continuación, la *aflD* (*nor-1*) codifica para una cetoreductasa necesaria para la conversión del NOR en averantina (AVN). Los genes homólogos *aflD* (*nor-1*), lo constituye el grupo formado por el *aflE* (*nor A*) y *aflF* (*nor B*), se cree que codifican para una alcohol deshidrogenasa. Estas proteínas también pueden ser capaces de catalizar la reducción del NOR a AVN dependiendo del ambiente reductor de la célula. A continuación, la conversión de AVN a hidroxiaverantina (HAVN) es catalizada por una monooxigenasa codificada por el gen *ord-1* (*aflG* o *avnA*), mientras que el gen *aflH* (*adhA*) codifica para otra alcohol deshidrogenasa que interviene en la conversión de la HAVN en la averufina (AVF) (Levin, 2012). También se ha reportado que la Averufanina es un metabolito derivado y no un metabolito genuino o intermediario en la vía aflatoxigénica (Yu y Ehrlich, 2011).

La conversión de la AVF a la versiconal acetato de hemiacetal (VHA) implica la actividad de una citocromo P450 monooxigenasa codificada por el gen *cypX*. En esta conversión también es importante el gen *aflI* (*avfA*). Es posible que el producto del gen *avfA* se asocie con la P450 monooxigenasa para llevar a cabo la conversión. Luego, una esterasa participa en la conversión de VHA a versiconal (VAL). La esterasa es codificada por el gen *aflJ* (*estA*). Posteriormente, el VAL se convierte en la versicolorina B (VER B) por la versicolorina B sintasa codificada por el gen *vbs* (*aflK*). En este punto ocurre una bifurcación que conduce a la formación de cualquiera de los tipos principales de aflatoxinas AFB1/AFG1 o AFB2/AFG2. La conversión de VER B a versicolorina A (VER A) requiere la activación del gen *aflL* (*verB*) que codifica para la VER B desaturasa. Las condiciones de cultivo parecen afectar significativamente la actividad de la VER B desaturasa y por lo tanto, la relación definitiva de AFB1 a AFB2 y AFG1 a AFG2 (Yu, 2012).

Los pasos de conversión bioquímica desde VER A a desmetil esterigmatocistina (DMST) implican la actividad de dos genes *aflM* (*ver-1*), *aflN* (*verA*), mientras que el gen *aflO* (*omtB*, *dmtA*) que codifica para la O-metiltransferasa B, enzima que presenta dos actividades distintas, es decir, la conversión de DMST a esterigmatocistina (ST) así como en la conversión de dihidrometilesterigmatocistina (DHDMST) a dihidroesterigmatocistina (DHST). Posteriormente, la O-metiltransferasa A interviene en la conversión del ST a o-metilesterigmatocistina (OMST) y de la DHST a dihidro-o-metilesterigmatocistina (DHOMST). El gen para O-metiltransferasa A es la *omt-1* (*omtA* o *aflP*). Finalmente, el gen *aflQ* (*ord A* o *ord-1*) está implicado en la conversión de OMST de AFB1 y AFG1 y DMDHST a AFB2 y AFG2 (Yu *et al.*, 2004).

Es importante comentar que tal como se indicó inicialmente, algunos genes están involucrados en la regulación de la producción de aflatoxina, entre ellos, el gen *aflR* (*afl-2* o *apa-2*) el cual está implicado en la activación de la transcripción. El gen codifica una proteína de unión a una secuencia ADN específica y se ha demostrado que se requiere para la activación transcripcional de la mayoría, si no todos, los genes estructurales. La transcripción de los genes de la vía para la producción de la aflatoxina se pueden activar cuando la proteína *aflR* se une a la secuencia palindrómica en la región promotora de los genes estructurales de *A. parasiticus*, *A. flavus*, y *A. nidulans*. Cabe mencionar que en *A. sojæ*, una cepa no toxigénica utilizada en fermentaciones industriales, se encontró que contenía un gen defectuoso *aflR* además de otros defectos en los genes estructurales de la vía de las aflatoxinas. Por lo tanto, en ausencia de la proteína reguladora funcional, no ocurre la inducción a la producción de la aflatoxina (Yu, 2012).

Por último, el gen *aflS* (*aflJ*) también se encuentra implicado en la regulación de la transcripción. Un estudio reciente ha demostrado que el gen *aflS* interactúa con el *aflR* pero no con los genes estructurales. En cepas mutantes, la pérdida del gen *aflS* se asoció con una reducción de 5 - a 20 veces la expresión de algunos genes de la ruta de aflatoxina, tales como *aflC* (*PksA*), *aflD* (*nor-1*), *aflM* (*ver-1*) y *aflP* (*omtA*) y una pérdida de la capacidad para sintetizar productos intermedios de aflatoxina (Yu *et al.*, 2004).

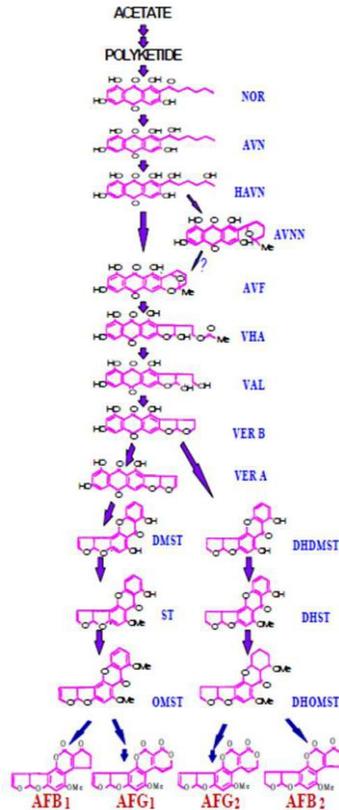


FIGURA 8. Esquema de la ruta biosintética de las principales Aflatoxinas. NOR, Ácido Norsolónico, AVN averantina, HAVN hidroxiaverantina, AVNN averufanina, AVF averufina, VHA versiconal acetato de hemiacetal, VAL versiconal, VAL, VER B versicolorin B, VERA versicolorin A, DMST desmetil esterigmatocistina, DHDMST dihidrometilesterigmatocistina, ST esterigmatocistina, DHST dihidroesterigmatocistina, OMST o-metilesterigmatocistina, DHOMST dihidro-o-metilesterigmatocistina. Aflatoxina B1, aflatoxina B1, aflatoxina G1, AFG1, aflatoxina G2. (Fuente: Yu, 2012).

2.2.2.3.3.- GENES DE EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGENICOS POR PCR

Teniendo en cuenta la ruta biosintética descrita en el segmento anterior, se han diseñado una serie de cebadores a partir de genes involucrados en las vías de biosíntesis de aflatoxinas. Los más importantes se presentan a continuación:

2.2.2.3.3.1.- GEN REGULADOR DE LA AFLATOXINA (*aflR*)

Uno de los genes más empleados para la detección de mohos aflatoxigénicos, es el

gen *aflR* (gen regulador positivo en la biosíntesis de la aflatoxina). Entre ellos, Somashekar *et al.*, (2004) realizaron un método basado en PCR de detección de especies de *Aspergillus* en muestras de harina de maíz estéril contaminadas artificialmente. Cebadores de genes específicos del gen *aflR* lograron diferenciar *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Los resultados positivos sólo se obtuvieron después de 12-h de incubación en medios enriquecidos con extractos de maíz inoculadas con *A. flavus* (10^1 esporas/g) y *A. parasiticus* (10^4 esporas/g).

De la misma manera, Manonmani *et al.*, (2005) evaluaron la presencia de mohos aflatoxigénicos en diferentes productos alimenticios con el *aflR*. La especificidad se ensayó con cultivos puros y mixtos de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium verrucosum*. De las cepas evaluadas, sólo *A. flavus* y *A. parasiticus* aflatoxigénicos mostraron una respuesta positiva de amplificación, al observarse una banda de 798 pb característica de *aflR*. Otros trabajos también destacan el uso del *aflR* de forma efectiva (Latha *et al.*, 2008).

2.2.2.3.3.2.- GENES DE LA VERSICOLORINA (*ver 1* y *ver A*), O-METILTRANSFERASA A (*omt-1* o *omt A*) Y O-METILTRANSFERASA B (*omt B*)

También destacan, el gen *ver* la cual es importante para la síntesis de la versicolorina A ya que es la primera molécula en la vía de la aflatoxina que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bisfurano (Peña, 2007). Asimismo, el gen *omt-1* codifica para la O-metiltransferasa, enzima que convierte esterigmatocistina a O-metilsterigmatocistina. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva, y su inclusión puede ser utilizada para diferenciar entre los hongos que producen aflatoxinas y las que sólo pueden sintetizar esterigmatocistina. Ensayos empleando cebadores de estos genes han sido exitosos en la diferenciación de cepas productoras de aflatoxina y otros hongos (Mostafa *et al.*, 2012).

Del mismo modo, Latha *et al.*, (2008) estandarizaron la técnica utilizando cebadores para la o-metil transferasa (*omt*). Los resultados obtenidos evidenciaron la amplificación de *A. flavus* y *A. parasiticus* aflatoxigénicos empleando los genes *omt*, mientras que no hubo

amplificación para cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. glaucus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus* spp. empleando tales genes. De igual manera destaca el trabajo de Richard *et al.* (2009), quienes utilizan un protocolo de PCR en conjunto con HPLC-MS para la detección de los géneros *Aspergillus*, los resultados obtenidos revelaron que de los cebadores usados para los genes de la aflatoxina *Omt1* fueron los más adecuado para la detección de *A. parasiticus* y *A. flavus*. Finalmente, Al-Hmoud *et al.*, (2012) destacan las aplicación de la PCR en la detección de *A. parasiticus* aflatoxigénicos en muestras de alimentos usando cebadores *omtB*. El fragmento de ADN amplificado a partir del cebado empleado fue de 611 pb.

2.2.2.3.3.3.-GEN DE LA ÁCIDO NORSOLORINICO REDUCTASA (*nor 1* o *aflD*)

El gen *nor 1* codifica para la enzima que cataliza la cetoreducción de ácido norsolorinico (primer intermediario en la ruta) a la averantina (Priyanka *et al.*, 2012). Passone *et al.*, (2010) utilizan el *nor-1* para controlar y cuantificar especies del género *Aspergillus* en maní. Los granos se acondicionaron a cuatro niveles de actividad de agua (Aw) y se almacenan durante un período de 4 meses. Las pruebas de sensibilidad demostraron la presencia de ADN perteneciente a *A. parasiticus* en todo el período de almacenamiento, independientemente de la metodología de cuantificación aplicada. En total se registraron niveles de aflatoxinas entre 1,1 hasta 200,4 ng/g de cacahuets acondicionados a valores altos de actividad de agua (0,94 - 0,84 aW). El ensayo desarrollado parece ser una herramienta prometedora en la predicción del potencial de riesgo aflatoxigénico en cacahuets almacenados, incluso en caso de infecciones de bajo nivel.

De igual forma, Abdel *et al.*, (2010) resaltan la utilización del *nor-1* para la detección de *Aspergillus flavus* en maní almacenados en tres niveles de actividad de agua (0,95, 0,90 y 0,85 aW) durante seis semanas. Hubo diferencias significativas en la expresión del gen *nor-1* en los tres niveles de actividad de agua. Los investigadores afirman la utilidad de dicho gen para predecir el riesgo potencial de la producción de aflatoxinas durante el almacenamiento.

2.2.2.3.3.4.- DETECCIÓN DE MOHOS AFLATOXIGÉNICOS USANDO VARIOS GENES

La detección por PCR de genes de biosíntesis de aflatoxinas no siempre tiene éxito para distinguir entre las cepas aflatoxigénicas de las no aflatoxigénicas. Esto se debe a las mutaciones inter e intra específicas en el sitio de unión al cebador (Levin, 2012). Razón por el cual se realizan ensayos con la utilización de varios cebadores, con la finalidad de correlacionar el perfil de expresión de genes de la biosíntesis de aflatoxinas con la producción de aflatoxinas en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Degola *et al.*, (2007 y 2009) emplearon los genes *aflQ*, *aflO*, *aflD*, *aflS* y *aflR*, logrando mostrar una buena correlación entre la expresión génica y la producción de aflatoxinas. En este sentido, Scherm *et al.*, (2005) diferencian cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* productores y no productores de aflatoxinas. Los resultados evidenciaron que el perfil de expresión de los genes *aflD* (*nor*), *aflO* (*omtB*), y *aflP* (*omtA*) se correlacionaron con la capacidad de las cepas a producir aflatoxinas en un medio de cultivo inductor (Extracto de levadura-Sacarosa).

Por otro lado, Rahimi *et al.*, (2008) analizaron 230 aislados fúngicos de pistacho para la detección de mohos aflatoxigénicos usando los genes *aflR*, *aflJ* y *omtB*, además de la aplicación de TLC para la detección de toxinas. De las 150 cepas de *A. flavus* probadas para la producción de aflatoxina por TLC, 46 se encontraron para producir aflatoxinas B1 y B2, mientras que sólo unas pocas producen bajas cantidades de G1. Todos los aislados de *A. parasiticus* produjeron aflatoxina. El cebador *aflR* produjo una banda esperada de 630 pb con todas las cepas de *A. parasiticus* y con 33 de las 46 cepas de *A. flavus* confirmadas para la producción de aflatoxina por TLC. El cebador *aflJ* generó una banda esperada de 840 pb con el 39 de las 46 cepas de *A. flavus* positivos para la producción de aflatoxina por TLC. El cebador *omtB* también generó una banda esperada de 611 pb con todos los 46 cepas de *A. flavus* positivas para la producción de aflatoxina por TLC y todas las cepas de *A. parasiticus*. Los autores concluyeron que, dado que las bandas de 611 bp correspondientes al cebador *omtB* fueron observadas en todos los aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus*

aflatoxigénicos analizados y su ausencia en las cepas de *Aspergillus* no productoras de aflatoxinas, los cebadores *omtB* son específicos para los hongos productores de aflatoxinas.

Es importante señalar que Paterson (2006) ha señalado que muchos mohos son conocidos por presentar vías metabólicas compartidas para la producción de aflatoxinas y la esterigmatocistina. Por lo que cepas fuertemente productoras de esterigmatocistina como *A. versicolor* y *A. nidulans* pueden ser detectadas como cepas de *A. flavus* aflatoxigénico si se utiliza el cebador *omtB* como blanco para la PCR. El autor también advierte la necesidad de utilizar cebadores para cepas productoras de esterigmatocistina para evaluar la especificidad del grupo aflatoxigénico. Esta posible reacción cruzada también se puede aplicar al uso de cebadores dirigidos al gen *nor*. Patterson también ha indicado que el gen *aflR* puede ser un gen regulador conservada para el control de precursores de la aflatoxina en una serie de hongos no aflatoxigénicos. También sugiere que los genes *aflQ* y *aflP* que no están involucrados en la biosíntesis de esterigmatocistina pueden ser una opción válida como cebadores para la detección de *Aspergillus* aflatoxigénicos en alimentos.

El Khoury *et al.*, (2011), emplearon como cebadores el *aflJ* (*aflS*) y *aflR* para distinguir efectivamente entre *A. flavus* y *A. parasiticus*. Más recientemente, Jamali *et al.*, (2013) evaluaron la expresión de las cuatro genes de la ruta de biosíntesis de las aflatoxinas (*aflD*, *aflO*, *aflP* y *aflQ*) en 24 cepas de *Aspergillus flavus* aislado de los suelos de huertos de pistacho, con el objetivo de diferenciar rápidamente y con precisión cepas toxigénicas de las no toxigénicas. Las cantidades de aflatoxina B1 producidas por las cepas 20 aflatoxigénicos variaron desde 1,25 hasta 321,56 ng/mg de peso seco de hongos en medio YES. Los resultados mostraron que la transcripción de los cuatro genes no siempre se correlaciona con la producción de aflatoxinas. Sin embargo, el patrón de expresión de *aflO* y *aflQ* encontrado que se correlaciona bien con las cantidades de aflatoxina B1, por lo que los autores sugieren que los genes *aflO* y *aflQ* pueden utilizarse para inferir la capacidad de producción de aflatoxinas en cepas de *A. flavus*.

Finalmente, en revisiones recientes se ha indicado que no existe un único cebador de PCR con fiabilidad para ser utilizado en la detección de mohos productores de aflatoxina ya que los genes precursores de aflatoxina también están involucrados en la síntesis de otras

toxinas fúngicas como esterigmatocistina, en mohos no aflatoxigénicos. Además de esto, es importante aclarar que la amplificación exitosa de una secuencia génica específica no se puede tomar como prueba de la producción de aflatoxina ya que el gen puede ser críptico y no expresarse debido a una mutación externa no detectada en la secuencia a amplificar. No obstante, el uso de cebadores dirigidos a los genes *aflR*, *Nor*, *ver* y *omt* parecen ser los más promisorios en la detección de mohos productores de aflatoxinas

2.2.2.3.1.- MICROSATÉLITES

Los microsatélites, también conocidos como SSRs (del inglés Simple sequence Repeats) son secuencias hipervariables de ADN que se repiten en tándem de uno a seis pares de bases que representan una clase de ADN repetitivo comúnmente encontrado en el genoma nuclear. Estos loci pueden ser amplificados mediante PCR utilizando cebadores específicos los cuales reconocen secuencias únicas de los flancos de las regiones hipervariables. Los marcadores M13 son en su mayoría los marcadores de tipo aleatorio, que se cree que son de gran utilidad para la diversidad genética, estudios filogenéticos y se han utilizado para determinar la similitud y la disimilitud entre cepas de *A. flavus* (Hatti *et al.*, 2010).

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- CEPAS

Se utilizaron aislados del hongo *Aspergillus flavus*, provenientes del cepario del Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela, micotoxigénicos o no, los cuales fueron mantenidos por subcultivo en medio agar papa dextrosa (PDA). Asimismo, fueron utilizados cepas de *Aspergillus flavus*, toxigénicas obtenidas de la Fundación para la Investigación Agrícola Danac. Para los ensayos de actividad amilasa se usó adicionalmente una cepa amilolítica de *Trichoderma asperellum* (TV190) perteneciente al cepario del Centro de Biotecnología Aplicada de la Universidad de Carabobo, aislada y descrita por Pavone y Dorta (2015).

3.2.- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE LAS CEPAS.

Las cepas obtenidas fueron sembradas por separado en fiolas con 50 g de arroz comercial estéril. Se incubaron a temperatura ambiente por 15 días. Para la extracción de aflatoxinas se añadieron 100 mL de cloroformo a 90°C a las fiolas de cada muestra, luego se agitó y se filtró con papel Whatman nº1. Se recolectó el filtrado, se concentró por evaporación en baño de María, se resuspendió en 200 µL de cloroformo y luego se desarrolló la cromatografía de capa fina. Para ello, se tomaron alícuotas de 20 µL de las ocho muestras filtradas y el estándar de aflatoxina B₁, se colocaron en una placa de sílica gel, luego se sumergió en el tanque cromatográfico que contenía una mezcla de 45 mL de cloroformo y 5 mL de acetona. Pasados 50 minutos, se retiró la placa y se evaporó el solvente, para evaluar bajo radiación UV a 365 nm la presencia de aflatoxinas.

3.3.- CULTIVOS MONOSPÓRICOS

La obtención de aislados con una sola cepa es crucial para los estudios moleculares. Para obtener cultivos monóspóricos, se agregó una pequeña cantidad de esporas con un asa de platino en 10 mL de agua destilada estéril (dilución). El volumen completo de esta suspensión se adicionó en una placa de agar agua, descartado inmediatamente el contenido. Posteriormente, se incubó durante 18-20 horas en luz fluorescente continua a 25°C. Haciendo uso de un microscopio estereoscopio a 20X, se seccionaron trozos de agar con

una única espora germinada, la cual se colocó en el centro de una placa con PDA, incubada bajo las mismas condiciones por siete días.

3.4.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS A NIVEL TAXONÓMICO DE ESPECIE.

Se realizó una identificación morfológica preliminar a nivel taxonómico de género de los aislados mediante montajes de los mismos en láminas portaobjetos para la observación al microscopio de estructuras características de *Aspergillus*. Asimismo, previo al estudio, se realizó la identificación de cepas toxigénicas y no toxigénicas de *A. flavus* en el ICTA mediante cromatografía en capa fina tal como se describe en 3.2.

3.5.- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

3.5.1.- EXTRACCIÓN DE ADN.

Los cultivos monospóricos obtenidos se inocularon en frascos con caldo papa dextrosa por 72 horas. A partir del micelio obtenido secado en servilletas estériles, se realizó la extracción de ADN genómico utilizando la metodología descrita por Aljanabi y Martínez (1997). El procedimiento fue el siguiente: el micelio se homogeneizó en 400 μ L de buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20 mM; pH 8,0) en un tubo eppendorf de 1,5 mL de capacidad. Seguidamente, se agregó 40 μ L de SDS (20 %). Los tubos fueron incubados durante una hora a 60 °C, adicionándose posteriormente 300 μ L de NaCl (6M). Cada tubo fue agitado en vortex a máxima velocidad por 30 s y centrifugado a 10.000 rpm durante 20 min. A continuación, se transfirieron 700 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf al que se le agregó el mismo volumen de isopropanol puro frío, el cual se agitó suavemente por inversión e incubándose a -20 °C por 1 h. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%. El precipitado seco fue resuspendido en 50 mL agua ultrapura estéril y mantenido a -20 °C.

3.5.2.- Amplificación de las regiones ITS del rDNA y con el microsatélite M13.

A partir del ADN extraído se procedió a amplificar por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las regiones ITS del rDNA y con el microsatélite M13, con el Kit Go Taq (Promega). Para cada reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 μ L de la mezcla de reacción. Las condiciones de amplificación para las regiones ITS1 e ITS2 del

rDNA fueron las siguientes: Buffer T 5x 2,5 µL; MgCl₂ (25 mM) 1,5 µL, dNTP (10 mM) 1,5 µL; cebador ITS1 (sense): 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3' (0,2 mM) 0,75 µL; cebador ITS 2 (antisense): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (0,2mM) 0,75 µL (White *et al.* 1990) para los genes ribosomales; 0,5 mL Taq ADN polimerasa (5 U/mL) en 12,5 µL de agua ultrapura estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 5 minutos; 45 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; finalmente se realizó una extensión a 72°C por 10 minutos.

Para la amplificación con el iniciador M13 se utilizó la misma composición de reacción usadas en la amplificación de la regiones ITS de rDNA, pero usando como iniciador: 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' (Abd-Elsalam *et al.*, 2010). Las condiciones para la amplificación fueron: 94°C x 3 min; (94°C x 60 seg, 45°C x 60 seg, 72°C x 120 seg) 40 ciclos; 72°C 10 min. Las amplificaciones fueron observadas en electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

3.5.3.- Secuenciación de los productos de PCR de las regiones ITS.

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CESAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la PCR de secuenciación se preparó una mezcla de 10 µL finales con 20 ng del templado y 10 pmol de los iniciadores ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3') e ITS 2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), por separado. Posteriormente, se agregaron 4 µL de mezcla de reacción (BygDye® Terminator 3.1, Applied Biosystem) con solución buffer y una mezcla de ddNTPs y dNTPs, completándose el volumen con agua de grado biología molecular. Las muestras preparadas fueron sometidas a 25 ciclos de PCR (98°C por 2 minutos; 59°C por 1 minutos y 60°C por 4 minutos). Finalmente, el ADN purificado y eluído en formamida fue procesado en un Secuenciador Automático modelo ABI 3130xl (Applied Biosystem).

3.5.4.- Análisis de secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 del rDNA, fueron analizadas comparándolas con la base de datos GenBANK (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando el servicio BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa *Clustal X 1.81*

(Thompson *et al.*, 1997), utilizando valores de penalización de extensión de *gaps* de 10,0 y de apertura de *gaps* de 0,2, tanto para el alineamiento por pares como para el múltiple, utilizando para ambos la matriz de sustitución de la serie BLOSUM. También se realizó un análisis de restricción de las secuencias ITS obtenidas usando los servicios en línea en: <http://www.aspergillusgenome.org/>. Finalmente, se realizó un análisis filogenético de las secuencias ITS usando el Programa TNT versión 1.5 (Goloboff *et al.*, 2008), usando parsimonia y secuencias ITS de *Trichoderma* como grupo externo.

3.6.- IDENTIFICACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS TOXIGENICAS

3.6.1.- Obtención de la enzima amilasa de *Trichoderma* TV190

Para la realización del ensayo se procedió a inocular la cepa amilolítica de *Trichoderma asperellum* (TV190) en una fiola conteniendo una almidón (0,5%) y sales minerales (Nutrisol K®) al 1%. El sistema se incubó en agitación rotatoria (90 rpm) a temperatura ambiente durante 48 Horas. Posteriormente, se centrifugó a 80 rpm durante 5 min en una microcentrifuga marca PSELECTA. El sobrenadante obtenido conteniendo las enzimas amilasas fue congelado hasta su procesamiento.

3.6.2.- Obtención de los extractos de cepa de *A. flavus* toxigénicos y no toxigénicos

Se procedió a inocular varias asadas de las cepas de *A. flavus* toxigénicos (2 y 3) y no toxigénicos (14 y 15) (previamente reactivados en arroz estéril) en 30 mL de extracto de levadura (caldo YES), respectivamente. Todos los inóculos fueron mantenidos en agitación continua durante 1 semana. Se centrifugó a 80 rpm durante 5 min para separar el micelio de los extractos conteniendo la toxina, los cuales fueron congelados hasta su procesamiento.

3.6.3.- Evaluación del efecto de la Aflatoxina sobre la actividad amilasa procedente de *Trichoderma* TV190.

Se agregó en tubos eppendorf 300 µL del sobrenadante amilolítico, 50 µL de almidón al 0,5 % p/v y 300 µL de los extractos de *A. flavus* toxigénicos y no toxigénicos por separado, obteniendo un volumen final de 650 µL. De la mezcla obtenida, 325 µL fueron congelados inmediatamente y los restantes 325 µL fueron incubados a 45°C por 24 h. Finalmente, a los tubos congelados (cantidad de glucosa inicial) e incubados a 45°C (cantidad de glucosa final) se les determinó la

concentración de glucosa. La actividad amilasa se reportó como la diferencia entre la concentración final e inicial obtenidas en μmol de glucosa/mL.h.

3.6.4.- Determinación de la Glucosa en los extractos de cepas de *A. flavus* toxigénicos y no toxigénicos.

Para la estimación de la cantidad de glucosa en los tratamientos, se utilizó la técnica descrita por Trinder (1969). La glucosa se oxida por la glucosa oxidasa para producir gluconato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es entonces oxidativamente acoplado con p-amino antipireno (4-AAP) y fenol en presencia de peroxidasas (POD) para producir un colorante rojo con un pico de absorción a 510 nm. Para ello, se utilizó un kit comercial para la determinación de glucosa por el método de glucosa oxidasa marca BIOSCIENCE.

3.6.5.- Análisis estadístico de la actividad amilasa

Los datos se analizaron estadísticamente mediante la realización de una prueba de ANOVA. Los resultados que mostraron diferencias significativas fueron comparadas usando la prueba de Tukey de comparación de medias. Se utilizó el programa Statistix v 8.0.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Capacidad de producción de aflatoxinas por TLC

Dentro del conjunto de cepas usadas en este trabajo, habían algunas que ya habían sido identificadas como toxigénicas, específicamente aquellas provenientes de la Fundación Danac. Sin embargo, para las cepas aisladas de maíz en el Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (ICTA), se debió realizar la confirmación por cromatografía en capa fina (TLC) de su capacidad de producir aflatoxinas. Al desarrollar la corrida cromatográfica, se encontraron tres cepas toxigénicas y cinco no toxigénicas. El resumen de las cepas utilizadas, origen y capacidad toxigénica según TLC, puede observarse en la **Tabla I**. Según los resultados de los TLC de Fundación Danac y los realizados en este trabajo, arrojaron que de la cepa 1 a la 12, son toxigénicas, mientras que de la cepa 13 a la 17 son no toxigénicas.

Tabla I Cepas de *A. flavus* usadas en este estudio, origen y capacidad de producir aflatoxinas.

Cepa	Origen	Capacidad toxigénica según TLC
1	Aislados de maíz Ospino IB-LPV (Fundación Danac)	+
2	Aislados de maíz TTM-LPV (Fundación Danac)	+
3	Aislados de maíz DKA-LPV (Fundación Danac)	+
4	Aislados de maíz MA-LPV (Fundación Danac)	+
5	Aislados de maíz LG-LPV (Fundación Danac)	+
6	Aislados de maíz TUREN I (Fundación Danac)	+
7	Aislados de maíz MELLADO I (Fundación Danac)	+
8	Aislados de maíz SD-2004-LPV (Fundación Danac)	+
9	Aislados de maíz ARAURE I (Fundación Danac)	+
10	Aislados de maíz (ICTA)	+
11	Aislados de maíz (ICTA)	+
12	Aislados de maíz (ICTA)	+
13	Aislados de maíz (ICTA)	-
14	Aislados de maíz (ICTA)	-
15	Aislados de maíz (ICTA)	-
16	Aislados de maíz (ICTA)	-
17	Aislados de maíz (ICTA)	-

4.2.- Identificación de las cepas de *A. flavus*.

Para la identificación de cepas de hongos a nivel taxonómico de especie, pueden utilizarse metodologías que incluyen la observación de características morfológicas que pudieran estar influenciadas por el ambiente. Este tipo de técnicas requieren mucha experiencia en la realización de observaciones microscópicas para lograr una correcta identificación. En este trabajo se realizaron observaciones preliminares al microscopio, para confirmar la presencia de estructuras típicas del género *Aspergillus* (datos no mostrados), para obtener una identificación taxonómica a nivel de género. Otra técnica para identificar cepas es la molecular, que aunque también requiere cierta experticia relacionada al uso de técnicas moleculares y bioinformática, la misma no basa la identificación en características que están influenciadas por el ambiente, por lo que, si se aplican adecuadamente estas técnicas moleculares, es posible realizar una correcta identificación, basada en relaciones filogenéticas. Otra desventaja de la identificación morfológica es el tiempo que se requiere para poder llevarlas a cabo. En este sentido, las técnicas moleculares son mucho más rápidas (Arrúa *et al.*, 2012; Pavón *et al.*, 2008; Abdin *et al.*, 2010).

Uno de los primeros pasos para una correcta identificación molecular es la obtención de cultivos monospóricos. Las colonias provenientes de una única espora, garantizan cultivos con una sola especie. La coexistencia de dos o más cepas o especies en una misma colonia, pudieran generar resultados poco fiables que alterarían las conclusiones del ensayo, al haber varias secuencias de ADN mezcladas en la misma muestra. A partir de los cultivos monospóricos se realizó la masificación y extracción del ADN genómico para la amplificación por PCR de los genes o regiones seleccionadas.

En las técnicas moleculares de identificación, es necesario definir el o los genes a estudiar, ya que de esto depende el llegar a conclusiones acertadas. En hongos, existen varias regiones del ADN que pueden utilizarse para identificar, dependiendo del nivel taxonómico al que se requiere llegar. A nivel de Reino pueden usarse exones de genes conservados; a nivel de Familia, pueden usarse genes mitocondriales; a nivel de especie, los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal; y a nivel de poblaciones, técnicas como RAPD o microsatélites (Geiser, 2004).

La técnica utilizada para extraer el ADN (Aljanabi y Martinez, 1997), se basa en un método rápido de lisis celular, degradación proteica, choque osmótico y posterior

precipitación del ADN con isopropanol. Esta técnica permite la obtención de ADN apto para la amplificación por PCR y es la técnica rutinaria utilizada en nuestro Laboratorio.

Tal como se señaló en la metodología, luego de obtener los cultivos monospóricos, se procedió a la extracción del ADN genómico a partir de micelio de las cepas de *A. flavus* evaluadas. En la electroforesis en gel de agarosa realizada (**Figura 9**) para la observación de la calidad del ADN obtenido, pueden apreciarse bandas discretas de alto peso molecular, lo cual indica la buena calidad de las muestras de ADN obtenidas. En algunas de las muestras, específicamente en la 2, 7 y 8, pudo apreciarse ADN degradado, evidenciado por una banda difuminada en la parte más baja de estos carriles. Sin embargo, aun en estas muestras, se evidenció la presencia de bandas discretas de alto peso molecular. En la figura solo se presenta la electroforesis de las cepas 1 a la 9, el resto de las cepas arrojaron resultados similares (datos no mostrados).

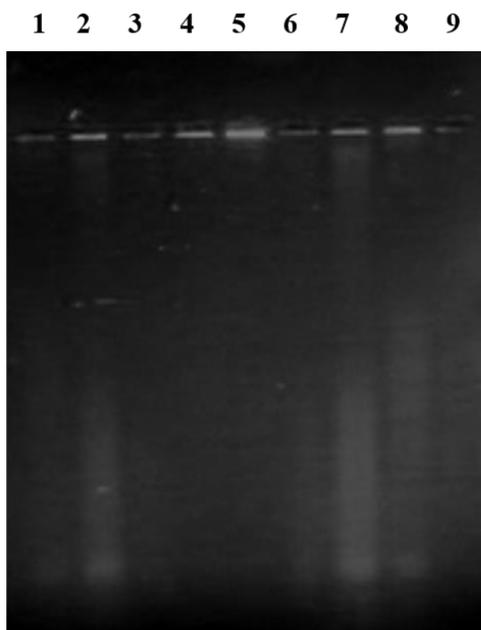


FIGURA 9. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) los productos de la extracción de ADN genómico de algunas cepas de *Aspergillus* utilizadas en este estudio (cepas 1 a 9).

Una vez obtenido el ADN, se procedió a realizar la amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal, a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En la **Figura 10**, se observa una electroforesis en gel de agarosa con los productos de

amplificación de las regiones ITS1 5,8S e ITS2 (cepas 1 a 10), con un peso molecular aproximado de 500 pb, que es el tamaño esperado para este tipo de productos. El resto de los aislados (11 a 17) presentaron patrones de banda similar (datos no mostrados). En el carril 2 puede apreciarse el control negativo de la amplificación (reacción sustituyendo el ADN por agua) sin banda. En un primer intento se realizaron reacciones de PCR con el ADN sin diluir, lo cual dio como resultado reacciones negativas en todos los casos (datos no mostrados), por lo que se realizaron diluciones 1/50 de todas las muestras de ADN genómico, ya que la presencia de una gran cantidad de ADN junto con restos del proceso de extracción, podían estar afectando la reacción. Una vez realizadas las reacciones de PCR con las diluciones, se logró obtener el resultado de la **Figura 10**.

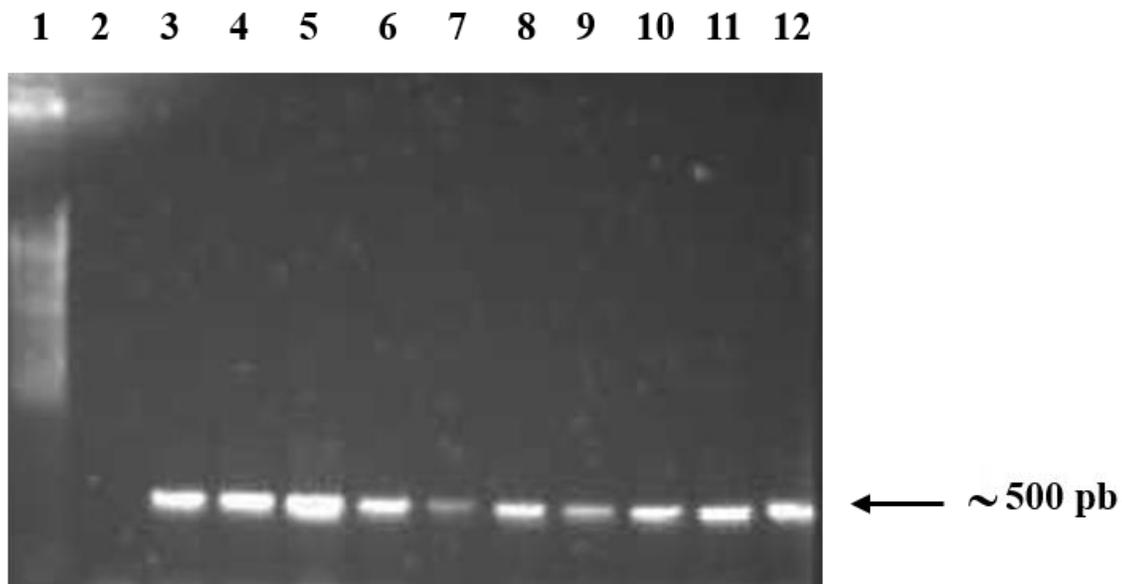


FIGURA 10. Electroforesis en gel de agarosa (1,2 %) de los productos de PCR de las regiones ITS1 5,8S e ITS2. **Carril 1:** Patrón de Peso Molecular. **Carril 2:** Control negativo. **Carriles 3-12:** Algunas cepas de *Aspergillus* bajo estudio (cepas 1 a 10).

La identificación de las cepas de *A. flavus*, se logra comparando las secuencias de los genes en estudio, por lo que el siguiente paso fue purificar los productos de PCR y secuenciarlos. En este caso se secuenciaron los productos de las reacciones de PCR utilizando el iniciador ITS1 como cebador de la reacción de secuenciación, con la finalidad de obtener las secuencias de una de las hebras del ADN en estudio. La finalidad de estudiar

en este trabajo las regiones ITS es, en primer lugar, identificar las cepas a nivel taxonómico de especie, y en segundo lugar determinar si existe alguna diferencia en estas secuencias que pueda ayudar a discriminar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Aspergillus*. Los resultados de las secuencias obtenidas se muestran en la **Tabla II** para el iniciador ITS1 (forward).

Tabla II. Secuencias obtenidas de las regiones ITS1 5,8S e ITS2 del ADN ribosomal, con el iniciador ITS1 (forward).

Cepa	Secuencia
TOX 1	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTT CGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCG TCGTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG TCACCCGCTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA
TOX 2	GGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGG CCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCT AGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC CTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG CTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG CTGAACTTAAGCATATCATAA
TOX 3	AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGG GCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATC TAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG AACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC CCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC GCTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCGTGAACTTAAGCATATCAATAA
TOX 4	CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTT TCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTG TCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATC GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTC GTCGTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT GTCACCCGCTCTGTAGG
TOX 5	AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGG GCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATC TAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG AACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTC CCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCC GCTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC CGCTGAACTTAAGCATATCATAA
TOX 6	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTT CGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCG TCGTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG TCACCCGCTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA
TOX 7	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTT CGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCG TCGTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG TCACCCGCTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAA
TOX 8	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTT CGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCG TCGTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG TCACCCGCTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA
TOX 9	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTT CGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT

Las secuencias obtenidas de las cepas de *Aspergillus* fueron analizadas comparándolas con la base de datos GenBANK (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando el servicio BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos de la comparación de secuencias se presentan en el Apéndice 2, presentándose el mejor alineamiento que coincidió con la base de datos (código y porcentaje de identidad) para las secuencias obtenidas a partir del iniciador (ITS1 forward). La **Tabla III** resume la identificación de las cepas en estudio mostrando el mejor resultado. El sistema logró distinguir cuatro especies diferentes de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parvisclerotigenus* y *A. oryzae*, como posible identificación de las cepas. Cabe destacar que en la literatura, las tres primeras especies se reportan como aflatoxigénicos (Varga *et al.*, 2011; Amaike y Keller, 2011; Pitt *et al.*, 2013; Levin, 2012; Ezekiel *et al.*, 2014), mientras que *A. oryzae* no se reporta como productor de aflatoxinas (Kiyota *et al.*, 2011; Marui *et al.*, 2010; Levin, 2012).

Al iniciar el presente trabajo, se asumía que todas las cepas obtenidas pertenecían a *A. flavus*, con diferente capacidad de producir aflatoxinas. Sin embargo, los resultados evidencian que hay más de una especie dentro de las cepas estudiadas, lo cual denota la importancia de complementar los estudios morfológicos con los moleculares, para asegurarse de tener una identificación correcta. Es de resaltar que la identificación morfológica realizada en este trabajo, fue meramente preliminar. Es necesario que un experto en morfología del género *Aspergillus* realice una identificación detallada de las cepas, para poder comparar los resultados. Lo que si queda claro con estos hallazgos es que al obtener cepas a partir de muestras de maíz almacenado, con características similares a *Aspergillus* y de color verde, no puede asumirse que pertenecen a *A. flavus*, debiéndose realizar estudios más profundos para poder asegurarlo.

Al comparar los resultados obtenidos del BLAST para las secuencias con el iniciador ITS1F, la mayoría de las cepas toxigénicas presentan un alta similitud para secuencias en la base de datos del GenBANK identificados como *A. flavus*, a excepción de las cepas 7, 9, 11 y 12 que se identificaron como cepas de *A. oryzae* (no toxigénicos). La cepa 3, fue identificada como *A. parvisclerotigenus* (toxigénica) y las cepas 6 y 10 como *A.*

nomius (toxigénicas). En este sentido, casi el 70% de las cepas catalogadas como productores de aflatoxinas por TLC, fueron identificadas como especies toxigénicas del género *Aspergillus* con base en los análisis moleculares. Para el caso de las cepas no toxigénicas, todas excepto la 13 (80 % de las cepas), fueron identificadas como *A. oryzae* (no toxigénica). La cepa 13 fue identificada como *A. flavus*.

TABLA III. Identificación de las la cepas de *Aspergillus* en estudio, a partir de la comparación de secuencias obtenidas con la base de datos del GenBANK usando el servicio BLAST.

CEPA	ITS1 F				
	Identificación	Score	Identidad (%)	Gaps	
TOXIGÉNICOS	1	<i>A. flavus</i>	1057	100	0
	2	<i>A. flavus</i>	1037	100	0
	3	<i>A. parvisclerotigenus</i>	1042	99	1
	4	<i>A. flavus</i>	891	100	0
	5	<i>A. flavus</i>	1046	100	0
	6	<i>A. nomius</i>	1051	100	0
	7	<i>A. oryzae</i>	1050	100	0
	8	<i>A. flavus</i>	1057	100	0
	9	<i>A. oryzae</i>	1050	100	0
	10	<i>A. nomius</i>	920	100	0
	11	<i>A. oryzae</i>	1051	100	0
	12	<i>A. oryzae</i>	1044	100	0
NO TOXIGÉNICOS	13	<i>A. flavus</i>	1055	100	0
	14	<i>A. oryzae</i>	1035	99	1
	15	<i>A. oryzae</i>	1037	99	1
	16	<i>A. oryzae</i>	1050	100	0
	17	<i>A. oryzae</i>	1050	100	0

El valor de “gap” en la Tabla III, representa el número de espacios introducidos en un alineamiento para compensar (penalizar) las inserciones y deleciones en una secuencia en relación a otra. La “identidad” es la extensión en la cual dos secuencias de nucleótidos tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en un alineamiento. El “score” es la cantidad de coincidencias en relación a las no coincidencias en un alineamiento. Para maximizar el número de coincidencias, se agregan “gaps” al alineamiento, pero esto trae consigo penalizaciones a través del número de “gaps”. Todos estos parámetros permiten evaluar las semejanzas y diferencias entre las secuencias estudiadas.

Según los resultados de la identificación molecular no todas las cepas pertenecen a *A. flavus*. La mayoría de las cepas que resultaron ser toxigénicas por TLC pertenecen a especies de *A. flavus*, *A. nomius* o *A. parvisclerotigenus*, todas especies reportadas en la literatura como toxigénicas. Solo cuatro aislados resultaron pertenecer a *A. oryzae*, el cual no es toxigénico y no concuerda con los resultados obtenidos por TLC. De esta forma, si bien se observa una clara tendencia a obtener identificaciones de especies toxigénicas que concuerdan con los resultados de TLC, la prueba no parece ser contundente en la diferenciación entre cepas toxigénicas y no toxigénicas. En contraste, también se observa una tendencia en las cepas no toxigénicas a identificarse en la mayoría de los casos como *A. oryzae*; sin embargo, no en todos los casos es así, por lo que la prueba sigue sin ser contundente, aunque es ampliamente conocida la existencia de cepas de *A. flavus* no toxigénicas. En estos casos, parecen ser necesarias pruebas adicionales para poder diferenciar entre cepas de *Aspergillus* toxigénicas de no toxigénicas. Otra recomendación en este caso dada la discrepancia entre los resultados de las dos técnicas, es la repetición de los ensayos de TLC para reconfirmar la toxicidad de las cepas.

La identificación morfológica realizada en este estudio fue meramente preliminar, basándose en características de las colonias y en la observación del conidióforo de las cepas en estudio, lo cual sugeriría que pertenecen al género *Aspergillus*. A pesar de ello, debido a estas características aunadas a su origen (granos de maíz), se presumía que todas las cepas pertenecían a *A. flavus*. Esto resulta interesante, ya que evidencia la confusión que pudiera existir al realizar identificaciones morfológicas si no se hacen estudios exhaustivos al respecto por personal calificado. La identificación morfológica está influenciada por las condiciones ambientales, incluso en casos como el del hongo *Trichoderma*, la homoplasia en los caracteres morfológicos hace a la identificación morfológica difícil, incluso para expertos (Druzhinina y Kubicek, 2005), haciéndose necesario complementar este tipo de estudios con resultados moleculares para poder realizar una correcta identificación. En los casos de las cepas de este trabajo, los resultados moleculares permitieron esclarecer la especie a la que pertenece cada cepa.

Para lograr diferenciar entre cepas de *A. oryzae* de especies como *A. flavus* y *A. parasiticus*, se han utilizado cepas de referencia de *A. oryzae* obtenidas de Japón

(Hiroshima Prefectural Food Technology Research Centre, Hiroshima) para efectos de comparación (Sooriyamoorthy *et al.*, 2004), Todos los aislados fueron inoculados en agar *Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Parasiticus* (AFPA), para lograr diferenciar los aislados obtenidos de *A. flavus* y *A. parasiticus* con base en el color del reverso de la placa. Esta identificación preliminar fue complementada con un esquema de identificación que describe especies comunes de *Aspergillus* y sus teleomorfos. Adicionalmente, estos aislados y la cepa de referencia fueron sembrados en medio Czapeck Yeast Extract Agar (CYA) observándose las características macroscópicas y microscópicas.

El medio AFPA descrito en Corry *et al.*, (2003) es un medio selectivo para la enumeración de los hongos productores de micotoxinas en alimentos *A. flavus* y *A. parasiticus*. Este medio de cultivos da como resultado suficiente desarrollo de color como para reconocer colonias de *A. flavus* en 48 horas a 30 ° C. El medio AFPA está compuesto de extracto de levadura, petona, hierro (III), citrato de amonio, dicloran y cloranfenicol. *A. flavus* y *A. parasiticus* producen una coloración amarillo-naranja observada en el reverso de la placa. *Aspergillus niger* produce colonias con un color en el reverse de la placa amarillo claro. Luego de 24-48 horas *A. niger* produce conidias negras, lo cual confirma la identificación. *Aspergillus ochraceus* produce una coloración amarillo naranja como *A. flavus*, pero solo forma la colonia luego de una incubación prolongada. Nótese que no existe un estudio único que pueda diferenciar entre las cepas, siempre es necesario utilizar varias metodologías para lograr este objetivo.

Varios autores han utilizado las secuencias ITS para identificar cepas de *Aspergillus* a nivel taxonómico de especie (Travis *et al.*, 2000). Los genes ITS del rDNA se utilizan como el “barcode” oficial para identificar hongos, debido a que es el marcador más frecuentemente secuenciado en hongos y poseen iniciadores que trabajan de forma universal. De esta forma, siempre se deben incluir las regiones ITS en el estudio de especies nuevas, aunque algunas veces estas secuencias no contienen suficiente variación como para poder distinguir entre todas las especies (Schoch *et al.*, 2012; citado en Samson *et al.*, 2014).

A diferencia de las toxinas bacterianas, que son principalmente péptidos y por lo tanto codificados por un gen único, las micotoxinas son estructuras con múltiples anillos y requieren de una secuencia estructurada de genes para su biosíntesis. Así, no existe una de PCR específica para detectar cepas micotoxigénicas. Por otro lado, los genes estructurales

usados en la detección por PCR de aflatoxinas, también están involucrados en la síntesis de otras micotoxinas como la esterigmatocystina por *A. versicolor* y *A. nidulans*, por lo que se carece de una especificidad absoluta para hongos aflatoxigénicos. Además, la presencia en el genoma de genes estructurales involucrados en la síntesis de aflatoxinas no garantiza la producción de la misma en todos los aislados (Levin, 2012). Este autor reporta que las regiones más usadas para la discriminación entre especies de *Aspergillus* son el complejo del ADN ribosomal, especialmente las regiones ITS1 e ITS2 y las regiones variables en el extremo 5' del gen 28S del rDNA. Debido a que estas secuencias no están relacionadas a los genes estructurales involucrados en la producción de aflatoxinas, las amplificaciones pueden ser usadas en la identificación de especies, pero no son capaces de confirmar la producción de aflatoxinas.

Para la identificación de especies de *Aspergillus* no solo se han utilizado los genes ITS. Las secuencias de genes como los de la betatubulina (BT2), calmodulina (CF) y RNA polimerasa II (RPB2) se han estudiado en 460 aislados de *Aspergillus*. Las secuencias de RPB2 y rDNA fueron combinadas y analizadas para determinar relaciones en el género. Los cuatro loci estudiados fueron usados en un análisis de concordancia genealógica. Los autores encontraron fragmentos de genes posiblemente parálogos que fueron amplificados con los iniciadores para BT2 en las secciones Nidulans, Usti y Nigri. El uso de secuencias no homólogas en los estudios de concordancia genealógica podrían llevar a conclusiones falsas por lo que los autores no recomiendan usar las secuencias BT2 para analizar estas secciones (Peterson, 2008).

Entre las especies identificadas se encuentra *Aspergillus parvisclerotigenus* (Mich. Saito & Tsuruta) Frisvad & Samson, cuya información básica se reporta a continuación (<http://www.aspergillus.org.uk/content/parvisclerotigenus>):

Referencia original:

Frisvad, J.C.; Skouboe, P.; Samson, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 28(5):450.

Sinónimo: *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*

Nombre actualmente aceptado (anamorfo): *A. parvisclerotigenus*

Nuevo metabolito: Acido kojico.

Index fungorum: 500166

Mycobank: 500166

A. flavus var. *parvisclerotigenus* fue elevado a nivel taxonómico de especie con base en la combinación de esclerocios pequeños, perfil de extrolitos y deferencias en las secuencias del ADN ribosomal (Frisvad *et al.*, 2005). *A. parvisclerotigenus* también ha sido reportado como patógeno en bulbos de ajo en Pakistan (Akhtar *et al.*, 2015). Estos autores lograron diferenciar esta especie de *A. flavus* y *A. oryzae* con base en su patrón de producción de micotoxinas en TLC y la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal. Para el caso de Venezuela, no se encontró en la literatura hallazgos de esta especie, siendo este el primer reporte de la especie en nuestro País. Cabe destacar que esta nueva especie fue reclasificada a partir de *A. flavus*, por lo que es posible que ya haya sido encontrada, pero clasificada bajo la vieja denominación, ya que para su diferenciación, se recomienda el uso del estudio de las secuencias ITS del ADN ribosomal.

Otra de las especies encontradas fue *Aspergillus flavus*. Esta especie está incluida en la Sección Flavi que comprende once especies muy relacionadas que producen diferentes perfiles de metabolitos secundarios. Una estrategia de seis pasos ha sido desarrollada para la identificación de nueve de las once especies de esta sección (Godet y Munaud, 2010). El proceso se inicia con tres reacciones de PCR en tiempo real pudiendo discriminar cuatro grupos: (a) *A. flavus/Aspergillus oryzae/Aspergillus minisclerotigenes/Aspergillus parvisclerotigenus*; (b) *Aspergillus parasiticus/Aspergillus sojae/Aspergillus arachidicola*; (c) *Aspergillus tamarii/Aspergillus bombycis/Aspergillus pseudotamarii*; y (d) *Aspergillus nomius*. Posteriormente, los autores recomiendan amplificaciones al azar de ADN polimorfico (RAPD) o digestión con la enzima SmaI, lo cual permite diferenciar a los grupos: (a) *A. flavus*, *A. oryzae* y *A. minisclerotigenes*; (b) *A. parasiticus*, *A. sojae* y *A. arachidicola*; (c) *A. tamarii*, *A. bombycis* y *A. pseudotamarii*. Con este sistema, solo *A. parvisclerotigenus* no puede ser diferenciada de *A. flavus*.

La tercera especie encontrada en este trabajo fue *A. oryzae*, que está reportado como un organismo no productor de micotoxinas. De hecho, es un hongo utilizado en la producción de componentes alimenticios para humanos. En estos casos, para obtener productos seguros, se debe tomar en cuenta si el organismo es no toxigénico y no

patogénico. Si esto se cumple, entonces se asume que los alimentos o sus derivados de ese organismo usando buenas prácticas de manufactura, son seguros para el consumo (IFBC, 1990). Pariza y Foster (1983) definen a un organismo no toxigénico como aquellos que no producen sustancias dañinas a niveles que son detectables o demostrablemente peligrosos bajo condiciones normales de uso o exposición. Asimismo, un organismo no patogénico es aquel que de forma muy improbable produce alguna enfermedad bajo condiciones normales. En el caso de *A. oryzae*, el mismo cumple con estas características de no toxigenicidad y no patogenicidad, además de no ser considerado patogénico (JECFA, 1987).

Algunos autores han estudiado la seguridad de *A. oryzae* en alimentos (Barbesgaard *et al.*, 1992); evidenciando un uso común y seguro en la industria de alimentos y ampliamente distribuido en la naturaleza. Por ejemplo, las enzimas de *A. oryzae* son aceptadas como constituyente de alimentos (JECFA, 1987) y es usado en la producción de salsas de soya desde 1958 (Barbesgaard, 1992; IFBC, 1990). De esta forma, los ingredientes obtenidos a partir de *A. oryzae*, cumplen con el criterio de “uso común en alimentos” y entra en la categoría de “generalmente reconocidos como seguros” (IFBC, 1990; Geiser, 2000; Chang *et al.*, 2006).

Por otro lado, Rank *et al.*, (2012), define a *A. oryzae* como una de las cepas de mayor uso en la industria y ha sido usada en la producción de salsa de soya, sake y otros productos tradicionales asiáticos. *A. oryzae* también es reconocido por la producción de amilasas, lipasas y proteasas y más recientemente en la expresión heteróloga de genes de metabolitos secundarios y proteínas no fúngicas (Punt *et al.*, 2002; citado en Rank *et al.*, 2012). Por muchos años, se pensó que *A. oryzae* era una forma domesticada de *A. flavus*. Sin embargo, algunos estudios de secuenciación de genes de cepas de ambas especies han demostrado su relación (Abe *et al.* 2006; citado en Rank *et al.*, 2012). La relación entre las dos especies se ha basado en una búsqueda del potencial tóxico de *A. oryzae*, pero no se ha encontrado evidencia genuina de la producción de aflatoxinas en cepas correctamente identificadas de *A. oryzae* (Rank *et al.*, 2012). En este trabajo se identificaron cepas de *A. oryzae* por metodología moleculares que presentaban producción de aflatoxinas verificado por TLC. En vista de estos hallazgos y comparándolos con los resultados de Rank *et al.*, (2012),

resulta fundamental en primer lugar verificar los resultados de TLC para estas cepas y en caso de que se obtengan los mismos resultados, repetir los ensayos de identificación molecular, antes de reportar cepas de *A. oryzae* con capacidad de producir aflatoxinas.

La otra especie encontrada en este trabajo fue *A. nomius*, que ha sido caracterizada en estudios que sugieren que es un importante productor de aflatoxinas en Brasil, donde su ocurrencia es investigada constantemente para diseñar estrategias para su prevención y control (Olsen *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2013) y en México (Guzman y Peña, 2005). *A. nomius* fue descrita como una nueva especie aflatoxigénica morfológicamente similar a *A. flavus* (Kurtzman *et al.*, 1987). Las cepas usadas en el trabajo de Kurtzman, fueron aisladas de insectos y productos agrícolas. La diferenciación con respecto a *A. flavus* se basó en la presencia de escleroicidios indeterminados y una temperatura óptima de crecimiento más baja. La comparación de relaciones por ADN mostraron que *A. nomius* evolucionó a partir de *A. flavus* and *A. tamaraii* (Kurtzman *et al.*, 1987).

A. nomius y *A. tamaraii* son especies de *Aspergillus* que fenotípicamente se asemejan a *A. flavus*, por lo que se han utilizado las secuencias de las regiones ITS, β -tubulina y calmodulina de aislados de importancia médica para su diferenciación (Tama *et al.*, 2014). En el estudio, solo 8 de 11 cepas reportadas como *A. flavus* por métodos morfológicos, fueron identificadas como *A. flavus* por los métodos moleculares aplicados, los otros tres aislados fueron identificados como *A. nomius* o *A. tamaraii*. Los resultados se corresponden con estudios metabólicos en los que *A. flavus*, *A. nonius* y *A. tamaraii* fueron separados en tres agrupamientos basados en cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectroscopía de masas. Así, ninguna de las cepas de *A. nomius* y *A. tamaraii* fueron correctamente identificadas con base en su morfología. Los autores recomiendan usar los genes de β -Tubulina y calmodulina para la identificación de *A. flavus*, *A. nomius* y *A. tamaraii*.

4.3.- Análisis de restricción de las regiones ITS

Un análisis adicional que puede realizarse con las regiones ITS es el análisis de restricción con algunas enzimas. La **Tabla IV** refleja el número de puntos de corte que cada enzima puede realizar en la secuencia ITS de cada cepa. La idea del análisis es buscar patrones de corte que pueda diferenciar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas. Los resultados evidencian que no hay un patrón único que pueda diferenciar entre estos tipos de cepas.

Tabla IV. Número de puntos de corte con varias enzimas de restricción, para las secuencias ITS obtenidas en este estudio.

Cepas	Afl I	BamH I	Bcl IV	Bsr fi	BglII	Cla I	Dra I	EagI	EcoR I	EcoRV	Hae II	Hinc II	HindII	NaeI	NgoM IV	Pst I	Sal I	SmaI	XmaI
Tox1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox2	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox3	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox4	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Tox5	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox6	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox7	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox8	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox9	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox10	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox11	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Tox12	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Ntox13	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
NTox14	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
NTox15	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
NTox16	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
Ntox17	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1

0, la enzima no corta la secuencia; 1, la enzima corta la secuencia

Algunas cepas de *Aspergillus* de importancia médica han sido estudiadas usando las regiones ITS, diseñando un perfil de PCR-RFLP para poder diferenciarlas. En esta investigación se utilizaron los mismos iniciadores de este trabajo (ITS1 e ITS4) para amplificar las regiones ITS. La enzima de restricción HhaI fue seleccionada como la mejor enzima para la diferenciación de cinco de las cepas. Este perfil de restricción de productos de PCR es aplicable como referencia en laboratorios de microbiología médica. La diferenciación de la mayoría de las especies de *Aspergillus* de importancia médica puede lograrse de forma más rápida, económica y confiable que los métodos de cultivo estándar (Mirhendi *et al.*, 2007).

Algunos autores han utilizado características moleculares a través de la PCR-RFLP de las regiones ITS y 5,8S. Los análisis de restricción en estos casos se realizaron con las

enzimas HhaI, HinfI y RsaI, distinguiendo once patrones diferentes, cuatro para la digestión con HhaI y RsaI y tres con HinfI, para la identificación de especies de *Aspergillus* de la sección Nigri (Kizis *et al.*, 2014).

Usando análisis de restricción de ADN mitocondrial, claramente pudieron diferenciar cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Los autores construyeron un mapa de restricción del genoma mitocondrial para cuatro enzimas (Moody y Tyler, 1990).

Siguiendo con la necesidad de poder identificar cepas de *Aspergillus* de importancia médica, rápida y correctamente; Diba *et al.*, (2014) realizaron estudios moleculares para el monitoreo de infecciones de *Aspergillus* e identificación del agente causal a nivel de especie. Estos autores usaron características morfológicas y moleculares, específicamente PCR-RFLP. De un total de 110 aislados el 47 % pertenecían a *A. flavus*, 29 % a *A. fumigatus* y 23 % a *A. niger*. Los autores concluyen que debido a la accesibilidad, velocidad y alta sensibilidad, la técnica de PCR-RFLP es muy útil, para la identificación de cepas de *Aspergillus* de importancia médica.

Algunos estudios para identificar las especies *A. fumigatus*, *A. lentulus* y *Neosartorya udagawae*, (las tres principales especies dentro de la sección Fumigati de importancia médica), han utilizado secuenciaciones multilocus para describir *A. lentulus* como una especie diferente de *A. fumigatus*. Los datos de secuencias utilizados por estos autores fueron del gen codificador de la β -tubulina (benA), el cual posee una alta variabilidad interespecífica en regiones intrónicas, pero es conservado entre aislados de la misma especie. Estos datos fueron desarrollados usando PCR-RFLP. La digestión del producto de la amplificación del gen benA con la enzima BccI, generó un patrón de bandas único, siendo los resultados validados por un análisis de las secuencias benA *in silico*. La técnica de PCR-RFLP con el gen benA resultó ser un método simple para la identificación de cepas de importancia clínica de la sección Fumigati con similitudes en su morfología (Staab *et al.*, 2009). Otros autores han logrado identificar cepas de *A. fumigatus* usando análisis de restricción del gen rodA con la enzima HinfI, el cual codifica para una proteína hidrofóbica (rodletA) (Van Pamel *et al.*, 2012).

Los resultados de este trabajo no coinciden con los obtenidos por Kizis *et al.*, (2014) para diferenciar especies de la Sección Nigri, ni con los de Mirhendi *et al.*, (2007) donde con un patrón de restricción, lograron diferenciar entre especies de *Aspergillus* de importancia médica. En nuestro caso se buscaban diferencias más específicas, que probablemente no podían ser encontradas por el estudio de las regiones ITS, ya que se trataba de comparar especies muy relacionadas. En estos casos la variabilidad en las regiones ITS no parece ser suficiente criterio como para lograr una diferenciación entre cepas toxigénicas y no toxigénicas.

4.4.- Análisis filogenético de las secuencias ITS.

Los análisis filogenéticos muestran las relaciones evolutivas entre varias especies que se cree que tienen una ascendencia común. Un árbol filogenético enraizado es un árbol directo, con un único nódulo que corresponde al ancestro común más reciente de todas las especies incluidas en el árbol. El árbol de la **Figura 11** se realizó con TNT usando parsimonia y secuencias ITS de *Trichoderma* como grupo externo. Del análisis, se obtuvieron 9 árboles posibles de 161 pasos, a partir de estos se obtuvo un árbol por consenso estricto (**Figura 11**) al que luego se le hizo un remuestreo con 1000 réplicas mediante Bootstrap. Los datos obtenidos demuestran que las secuencias usadas en el análisis de parsimonia no aportan información suficiente para establecer relaciones entre las cepas de *Aspergillus*, por lo que el análisis no fue capaz de discriminar entre las cepas estudiadas, al obtener un ancestro común para todas. Es importante señalar que todas las especies encontradas en este trabajo, pertenecen a grupos muy relacionados, lo cual es la causa más probable de la poca variabilidad entre ellas, que impidió encontrar diferencias en el árbol.

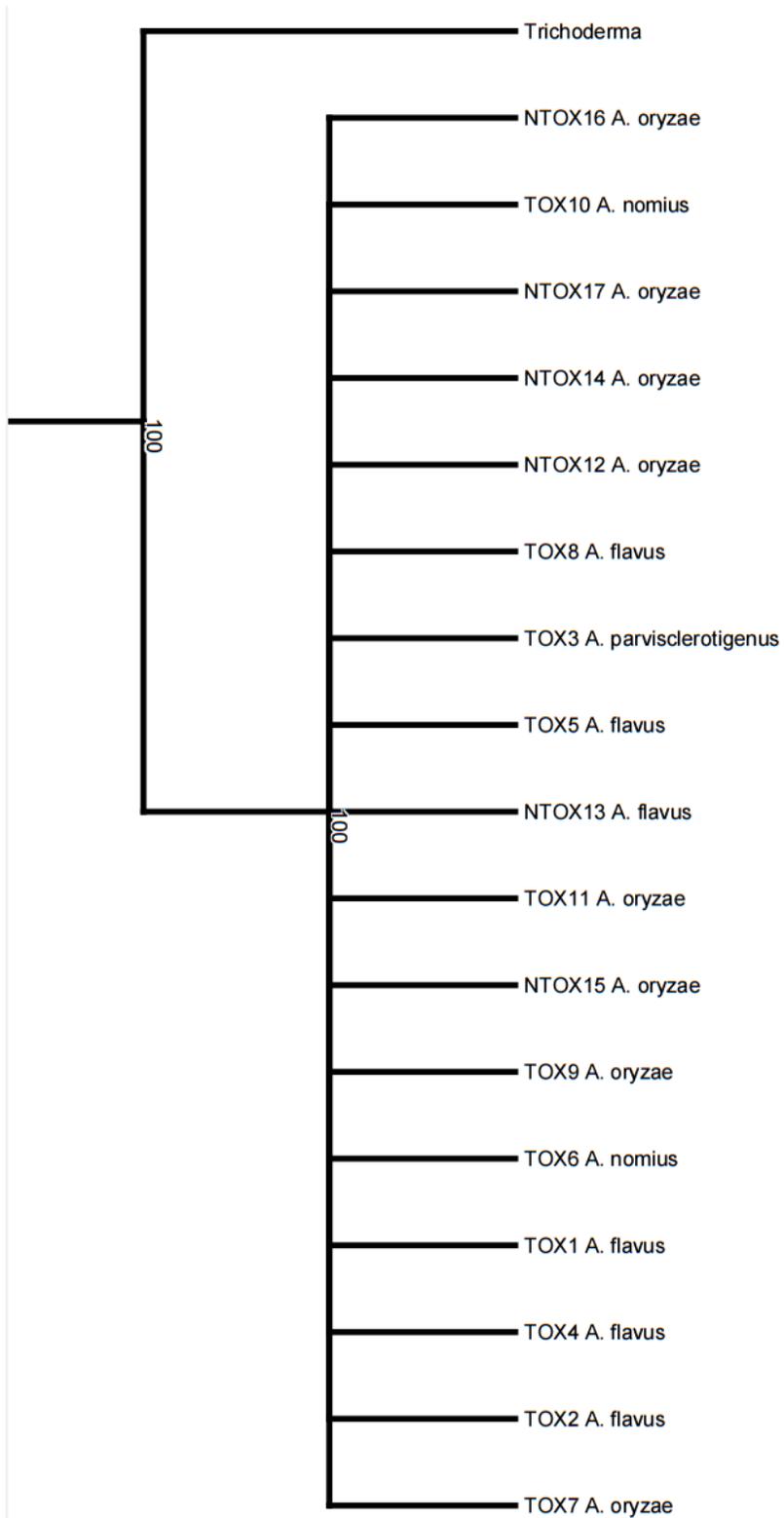


FIGURA 11. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias de *A. flavus* obtenidas con el iniciador ITS1.

El género *Aspergillus* comprende un grupo muy diverso de especies basado en caracteres morfológicos, fisiológicos y filogenéticos. Estas especies impactan profundamente la biotecnología, producción de alimentos y la salud humana y animal. *Aspergillus* ha sido tradicionalmente asociado a nueve generos teleomórficos, sin embargo datos filogenéticos sugieren que los géneros *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* y *Cristaspora*, forman un grupo monofilético junto con *Aspergillus* muy relacionado a *Penicillium* (Samson *et al.*, 2014). Algunos cambios propuestos en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, fúngica y algal, han traído como resultado la posibilidad de cambiar el nombre del género *Aspergillus* y usar sus respectivos teleomorfos, para cambiar un género grande por varios más pequeños. Así, la Comisión Internacional para la Taxonomía de *Penicillium* y *Aspergillus*, decidió mantener el género *Aspergillus*. Los análisis filogenéticos realizados por Samson *et al.*, (2014), dejan al género *Aspergillus* con 339 especies y recomiendan una técnica de trabajo estándar, proponiendo el estudio del gen de la calmodulina como marcador de identificación secundario.

Divakar *et al.*, (2015), describen el análisis filogenético molecular de secuencias de ADN utilizando marcadores de ADN ribosómico (rDNA), en particular, espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), los cuales se han utilizado ampliamente para delimitar las relaciones taxonómicas a nivel de especie, en conjunto con secuencias de genes de beta tubulina y calmodulina. En dicho estudio, la relación filogenética utilizando secuencias ITS logró la separación de dos grupos (clados) para los aislamientos de *A. flavus*, sin embargo, no se encontró clara separación entre las cepas toxigénicas y no toxigénicas, resultados que concuerdan con los encontrados en este trabajo. Hallazgos similares fueron reportados por Baird *et al.*, (2006) quienes afirmaron que los marcadores ITS no discriminaron entre aislamientos toxigénicos y no toxigénicos de *A. flavus*.

La taxonomía de la sección Nigri comprende una de las más complejas y confusas del género *Aspergillus*. Algunos autores han estudiado la filogenia de esta sección y su taxonomía mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1, 5,8S e ITS2 del rDNA (Castrillo *et al.*, 2012). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas a un tamaño de 532pb, para realizar un análisis filogenético con el programa TNT. Para

averiguar el árbol más parsimonioso, los autores usaron 100 ciclos RAS+TBR, respaldados con 1000 repeticiones por análisis Bootstrap y Jackknife. Del análisis de parsimonia, se obtuvieron 100 árboles con 568 pasos. Ambos análisis, Bootstrap y Jackknife, mostraron topología similar y diferencias mínimas en sus valores respaldados, mostrando que la sección Nigri está distribuida en dos grupos generales: uno compuesto por los clados *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. heteromorphus*; y el otro compuesto por los clados *A. aculeatus* y *A. homomorphus*, separados de las demás secciones del género *Aspergillus*. En el caso de la Sección Nigri, las secuencias de las regiones ITS si lograron diferenciar entre especies de *Aspergillus*, donde la diferencia filogenética entre las especies incluidas en el estudio, fue suficiente como para agruparlos en clados diferentes.

Algunas especies originarias de Grecia fueron estudiadas desde el punto de sus relaciones filogenéticas, usando las regions ITS e IGS (especiadores intergénicos) del rDNA, el gen de la β -tubulina (*benA*), la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II y dos genes mitocondriales (la unidad pequeña del rRNA (*rns*) y la subunidad I de la citocromo oxidasa (*cox1*)) (Krimitzas *et al.*, 2013). Las características morfológicas y los árboles filogenéticos de gen único, lograron diferenciar las especies estudiadas en secciones bien soportadas: Aenei, *Aspergillus*, Bispori, Candidi, Circumdati, Clavati, Cremei, Flavi, Flavipedes, Fumigati, Nidulantes, Nigri, Restricti, Terrei, Usti y Zonati, con pocas inconsistencias. Los autores lograron inferir un árbol filogenético usando *Neighbour-Joining*, Máxima Parsimonia y Métodos Bayesianos, obteniendo siete clados bien soportados dentro del género *Aspergillus* y concluyendo que con el uso de secuencias de genes nucleares y mitocondriales se logran herramientas adicionales para un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas del género *Aspergillus*.

Algunos autores han obtenido dendrogramas combinando iniciadores seleccionados que incluyeron PM1, OPW-04, OPW-05, P160, P54, P10 and OPA14 (Kermani *et al.*, 2016). Los resultados indicaron una distribución de 12 especies de *Aspergillus* en 8 grupos principales. Los coeficientes de similitud indicaron un amplio grado de similitudes y diferencias dentro y entre especies, sugiriendo diversidad genética intra e interespecifica, siendo el método de RAPD-PCR rápido, sesible y reproducible.

Se ha sugerido que la estructura secundaria del RNA transcrito podría proveer información útil en estudios de sistemática de hongos (Thangaraj *et al.*, 2011). Esta información morfológica no se encuentra en las estructuras primarias de las secuencias. Los

autores estudiaron 4 especies de *Aspergillus* usando las estructuras secundarias de las secuencias ITS del rDNA. Observando las estructuras, algunas topologías se conservaban en todas las especies y algunas variaban. Estas características podrían ser usadas en la identificación, ya que los árboles filogenéticos basados en secuencias y estructuras secundarias mostraron clados similares en las 4 especies de *Aspergillus*.

4.5.- Variabilidad genética con el iniciador para microsatélites M13.

Siguiendo con la caracterización molecular de las cepas evaluadas, se determinó su variabilidad genética usando el iniciador para microsatélites M13. La **Figura 13** presenta los productos de PCR para cada cepa. El patrón de bandeo arrojó que para las cepas toxigénicas ocho de doce cepas no presentaron ningún tipo de amplificación. Para las cepas no toxigénicas, todas presentaron amplificación, inclusive en los carriles 16 y 17 con bandas muy débiles. Si bien en cuanto a las cepas toxigénicas no hubo un resultado homogéneo que pudiera claramente diferenciar entre las cepas, pareciera ser evidente que los iniciadores son capaces de amplificar básicamente a las cepas no toxigénicas. Incluso, de las cepas toxigénicas que amplificaron con el iniciador M13, tres de ellas (9, 10 y 12) pertenecen a *A. oryzae*, especie reportada como no toxigénica. Esto refuerza la recomendación hecha anteriormente donde se sugiere repetir los ensayos de verificación de producción de aflatoxinas por TLC. De esta forma, los resultados sugieren que parece existir un patrón en el que la mayoría de las cepas no toxigénicas presentaron amplificación y la mayoría de la toxigénicas no.



FIGURA 12. Productos de PCR con el iniciador M13. **Carril 1:** Patrón de Peso Molecular (Producto de PCR del gen ITS). **Carril 2:** Blanco de PCR. **Carriles 3-13:** *A. flavus* (toxigénicos). **Carriles 14-19:** *A. flavus* (NO toxigénicos)

Es importante resaltar que las regiones M13 corresponden a secuencias repetidas en el genoma, por esta razón pudiera existir más de una banda en la amplificación. Un parámetro importante que no pudo ser estudiado en este trabajo es la variación de la estrictez de la reacción. La reacción de PCR puede ser más o menos específica, dependiendo de este parámetro, modificando la temperatura de “*annealing*”, mientras mayor sea esta temperatura, más exigente será la reacción, ya que bajo esta condición el sistema es más inestable y los iniciadores solo se aparearán en las zonas con mayor complementariedad de bases. Con menores temperaturas, el sistema es más estable y es posible que los iniciadores, se alineen en zonas con menor afinidad, dando resultados positivos, que a mayores temperaturas no se podrían dar. Este tipo de ensayos permite evidenciar variaciones genéticas en los genomas estudiados.

Uno de los experimentos planeados en el proyecto inicial de este trabajo fue la variación en la temperatura de “*anealing*” en la reacción de PCR con el iniciador M13. Lamentablemente, el agotamiento de varios reactivos, su escasez y posterior incremento de costos, fue imposible realizar el resto de las reacciones de PCR con las diferentes temperaturas planeadas. Estos ensayos deberán ser realizados cuando las condiciones se normalicen.

Algunos autores han reportado que en la identificación de cepas de *A. flavus* no toxigénicas obtienen una serie de bandas discretas de diferentes intensidades al someterlas a temperaturas de alineamiento de 30,7 °C y 47,4 °C, con un porcentaje de bandas polimórficas entre el 23,1% y el 69,9%, y un valor promedio de 45,5%, no obstante, dicho estudio no incluyó el análisis polimórfico de cepas toxigénicas de *A. flavus* (Houshyarfard *et al.*, 2015).

Los marcadores M13 son considerados como secuencias simples repetidas o *inter-simple sequence repeat* (ISSRS). Son en su mayoría marcadores de tipo aleatorio, que son de gran utilidad para la determinación de diversidad genética y estudios filogenéticos y se han utilizado para determinar la similitud entre cepas de *A. flavus* (Hatti *et al.*, 2010). Aunque estudios recientes no reporten correlación entre perfiles de bandas de ADN y la producción o no de micotoxinas (Yin *et al.*, 2009; Hatti *et al.*, 2010), la utilización del M13 en conjunto con otros iniciadores, en particular aquellos involucrados en la ruta biosintética de la aflatoxina, pueden permitir una aproximación a la discriminación entre cepas productoras o no productoras.

Un ensayo basado en PCR multiplex fue aplicado para la detección de cuatro genes localizados en diferentes loci que codifican para enzimas involucradas en la ruta biosintética de la aflatoxina en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Entre los genes estudiados están AflR, descrito como gen regulador funcionado como un activador de la transcripción, los otros genes son estructurales y llamados según el sustrato que utilizan: *Nor 1* (ácido norsolorinico), *Ver 1* (Versicolorina) y *Omt* (O methylosterigmatocystina). Los autores concluyen que la comparación de las características del cultivo y métodos de PCR mostró una buena relación, ya que los resultados de ambos métodos arrojaron las mismas conclusiones (Rashid *et al.*, 2008).

Se ha estudiado la relación genética entre cepas toxigénicas y no toxigénicas de *A. flavus*, colectadas de muestras de maní en China, con la finalidad de analizar deleciones dentro de la ruta biosintética de los *clusters* de genes de la aflatoxina. Para ello, los autores usaron un análisis RAPD y microsatélites, demostrando que los aislados toxigénicos y no toxigénicos de *A. flavus* no fueron agrupados basados en sus regiones y su habilidad de

producir aflatoxinas y esclerocios. Estos resultados fueron confirmados con los análisis de secuencias de ADN de las regiones ITS y los genes *pksA* y *omtA*. Las reacciones de PCR mostraron que 24 de 35 aislados con niveles no detectables de aflatoxinas poseían el *cluster* completo de genes para la aflatoxina. Once aislados atoxigénicos tuvieron cinco patrones de delección en el cluster. Así, los autores concluyen que los aislados toxigénicos y no toxigénicos de *A. flavus* son genéticamente similares, pero algunas cepas no toxigénicas tienen delecciones en los genes de la ruta biosintética de la aflatoxina, los cuales pueden ser identificados por PCR. Debido a que las delecciones extensivas dentro de los genes de la biosíntesis de aflatoxina no son raros en los aislados no toxigénicos, el análisis de delección se recomienda como método para un análisis rápido de cepas no toxigénicas para ser usadas en biocontrol contra cepas toxigénicas (Yin *et al.*, 2009).

La idea inicial de este trabajo, era la de usar la PCR como herramienta básica para la diferenciación entre cepas toxigénicas y no toxigénicas. Sin embargo, por problemas con el suministro de reactivos explicados anteriormente, no se pudo completar el ensayo de los iniciadores M13 variando la temperatura de “*annealing*”, ni estudiar la presencia de genes de la ruta biosintética de la aflatoxina como *nor1*, *aflR1*, *ver1* y *omt B*. Los iniciadores para la amplificación de estos genes sí pudieron ser adquiridos durante la ejecución de este proyecto y quedan a la espera del resto de los reactivos para retomar esta investigación. Para poder complementar el estudio, se realizó una prueba preliminar para verificar si era posible comprobar que la presencia de aflatoxinas en los sobrenadante de cultivos de *Aspergillus* líquidos podía inhibir la actividad de enzimas, específicamente amilasas provenientes de una cepa de *Trichoderma asperellum*.

4.6.- Inhibición de la actividad amilasa por cepas toxigénicas de *Aspergillus*.

En la búsqueda de posibilidades de establecer diferencias entre cepas productoras y no productoras de micotoxinas, se realizó la determinación de la actividad amilasa en presencia de sobrenadantes de cultivos de cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Aspergillus* y de esta manera evidenciar indirectamente la posible inhibición de la actividad amilasa por la presencia de la micotoxina. Los resultados de este ensayo se presentan en la **figura 13**, donde puede apreciarse que la mayor actividad amilasa se obtuvo en los tratamientos con sobrenadantes provenientes de cultivos con las cepas no toxigénicas, seguido de los

controles a los que se agregó agua destilada y finalmente la menor actividad se obtuvo en los tratamientos donde se agregó el sobrenadante proveniente de cultivos con cepas toxigénicas. Los análisis estadísticos (Apéndice 2), muestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos con sobrenadantes de cepas toxigénicas y no toxigénicas, mientras que entre ambos tratamientos y el control no se encontraron diferencias significativas. Los resultados sugieren una inhibición en la actividad amilasa por la presencia del sobrenadante de los cultivos con las cepas toxigénicas. Nótese que en todos los casos, la adición del sobrenadante de la cepa no toxigénica aumenta la actividad amilasa en comparación con el control, lo cual es indicativo que algún elemento en estos cultivos logra aumentar la actividad enzimática. En el caso de las cepas toxigénicas, la actividad cayó drásticamente, sugiriendo que a pesar de que pudieran haberse agregado los mismos elementos estimulantes de la actividad amilasa de las cepas no toxigénicas, la presencia de la micotoxina en estos sobrenadantes inhibió la actividad amilasa.

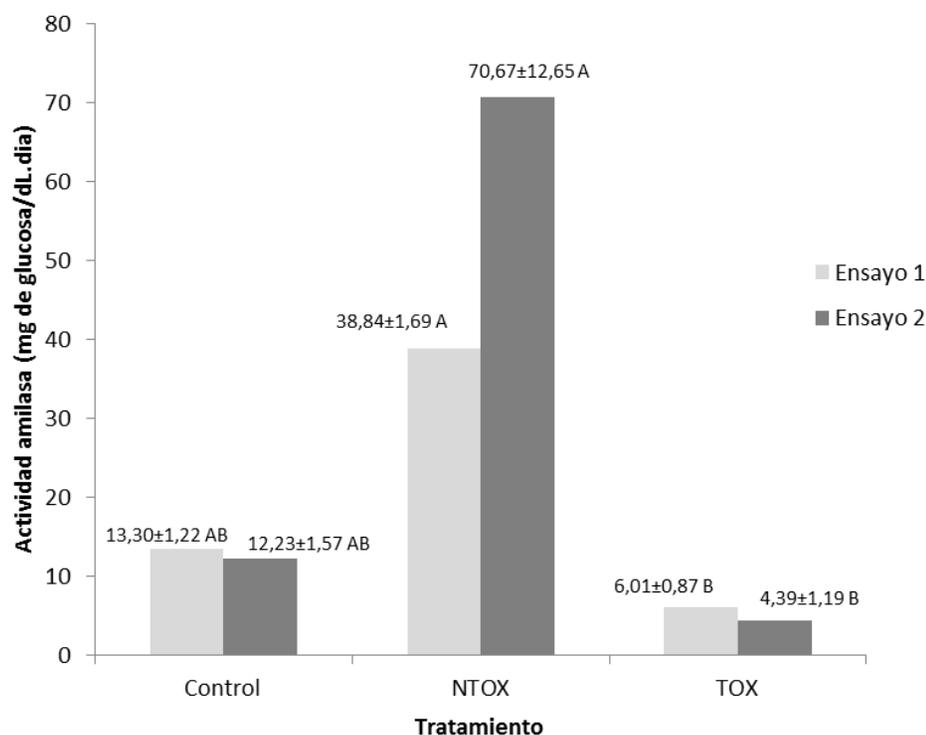


FIGURA 13. Actividad amilasa en presencia de sobrenadantes de cultivos con cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Aspergillus*. En el ensayo 1 se utilizaron las cepas 2 y 14; en el ensayo 2 se usaron las cepas 3 y 15. Los tratamientos con la misma letra, no presentan diferencias significativas entre sí.

La inhibición de la actividad amilasa por la presencia de la micotoxina es un evento que depende de la concentración de la misma. Las diferentes cepas de *Aspergillus*, pueden tener diferentes capacidades de producir aflatoxinas, por lo que su concentración en el sobrenadante podría variar entre cepas. En este trabajo no se determinó la cantidad de micotoxina en los extractos, ni se conoce la capacidad de cada cepa de producirla. Con este dato hubiera sido posible correlacionar el nivel de producción con la inhibición observada.

Un hallazgo interesante es el aumento de la actividad amilasa en el tratamiento con el sobrenadante proveniente de las cepas no toxigénicas en comparación con el control. Resulta evidente que la adición de este sobrenadante estimuló de algún modo la actividad amilasa en estos tratamientos. Por el contrario, en los tratamientos con el sobrenadante proveniente de cultivos con las cepas toxigénicas, la actividad amilasa disminuyó a niveles por debajo del control, aunque sin presentar diferencias significativas entre estos tratamientos. En este caso, la determinación de la concentración de la micotoxinas para cada tratamiento, arrojaría una mejor explicación del fenómeno observado.

En estudios con suero y cerebro de pollos sometidos a la aflatoxina B1, se logró obtener un incremento en la concentración de la glucosa lo cual asumen, es causada por la inhibición de enzimas glucolíticas, lo que sugiere que la aflatoxina posee una acción inhibidora sobre enzimas que participan en la síntesis de glucógeno, captación de la glucosa (disminución del transporte de glucosa de la sangre a las células) y la glucólisis (Parmar *et al.*, (2016). Algunos resultados obtenidos por Tessari *et al.*, (2006), reportaron bajos niveles de glucosa en las ratas tratadas con aflatoxinas. En cuanto a estudios realizados *in vivo* utilizando animales de experimentación, se destaca el incremento de la actividad amilasa pancreática en animales tratados con aflatoxinas. De acuerdo a la literatura, el incremento de la actividad amilasa en animales se genera como consecuencia de las heridas en el páncreas causadas por la toxina, lo cual es evidencia de lesiones locales en el órgano considerándose patológico y anormal (Han *et al.*, 2008; Yunus *et al.*, 2011).

En contraposición al efecto de la aflatoxina sobre amilasa pancreática en animales de experimentación, resulta necesario explorar el efecto de la aflatoxina sobre amilasas de diferentes fuentes. Por ejemplo, algunos estudios demuestran que las aflatoxinas afectan la actividad de la amilasa durante la germinación de las semillas, resultando en la inhibición de la hidrólisis del almidón y la consiguiente falta de disponibilidad de glucosa en el eje embrionario durante la imbibición (Navya *et al.*, 2013; Janardhan *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos sugieren un efecto inhibitorio por la presencia de aflatoxinas, lo cual podría usarse como una herramienta para la identificación de cepas productoras de micotoxinas, al comparar estos tratamientos con un control sin micotoxinas. Este tipo de ensayos podría incluso predecir si la cepa es sobreproductora de aflatoxinas al analizar el porcentaje de inhibición. Este tipo de predicción debe basarse en un estudio más detallado de los fenómenos observados, determinando la concentración de micotoxinas en cada caso, entre otros parámetros.

5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- Se lograron identificar las cepas de *Aspergillus* a nivel taxonómico de especie, usando las secuencias de los espaciadores transcritos internos 1 (ITS1) del ADN ribosomal. De las 17 cepas evaluadas e inicialmente identificadas como *A. flavus* por métodos convencionales, la identificación molecular logró distinguir entre especies de *A. flavus* (6), *A. nomius* (2), *A. parvisclerotigenus* (1) y *A. oryzae* (8).
- No fue posible discriminar claramente entre cepas toxigénicas y no toxigénicas mediante la utilización de secuencias ITS. Casi el 70% de las cepas catalogadas como productores de aflatoxinas por TLC, fueron identificadas como especies toxigénicas del género *Aspergillus* con base en los análisis moleculares. Mientras que para las cepas no toxigénicas, el 80% de las cepas identificadas como no toxigénicas mediante TLC, fueron identificadas como *A. oryzae* (no toxigénica). En este sentido, la prueba no parece ser contundente en la diferenciación, por lo que resulta necesario la realización de pruebas adicionales para poder diferenciar entre cepas de *A. flavus* toxigénicas de no toxigénicas.
- Se evidenció la necesidad de complementar la identificación morfológica con estudios moleculares para poder realizar una correcta identificación de cepas toxigénicas. En el presente estudio, la discrepancia entre los resultados de las dos técnicas, hacen conveniente la repetición de los ensayos de TLC para confirmar la toxicidad de las cepas.
- En el análisis de restricción con las regiones ITS no se evidenció un patrón de diferenciación entre las cepas estudiadas, por lo que la variabilidad en las regiones ITS no parece ser suficiente criterio como para lograr una diferenciación entre cepas toxigénicas y no toxigénicas.
- El análisis filogenético usando las regiones ITS no permitió la identificación molecular entre cepas toxigénicas y no toxigénicas, debido probablemente a que las especies encontradas están muy cercanamente relacionadas y los marcadores ITS no poseen la suficiente variabilidad como para diferenciarlas.
- La determinación de variabilidad genética de las cepas usando el iniciador para microsatélites M13 no evidenció una clara identificación de las cepas toxigénicas,

pareciera existir evidencia que este ensayo pudiera capaces de amplificar básicamente a las cepas no toxigénicas. Esto refuerza la recomendación de repetir los ensayos de verificación de producción de aflatoxinas por TLC. Se recomienda además la variación en la temperatura de “*annealing*” en la reacción de PCR. Lamentablemente, el agotamiento de varios reactivos, su escasez y posterior incremento de costos, fue imposible realizar el resto de las reacciones de PCR con las diferentes temperaturas planeadas.

- La utilización del M13 en conjunto con otros iniciadores, en particular aquellos involucrados en la ruta biosintética de la aflatoxina como *nor1*, *aflR1*, *ver1* y *omt B*, así como el gen de la β -tubulina y calmodulina, pueden permitir una aproximación a la discriminación entre cepas productoras o no productoras de aflatoxinas.
- La evaluación fisiológica mediante la determinación de la actividad amilasa indicó una inhibición en la actividad enzimática por la presencia del sobrenadante de los cultivos con las cepas toxigénicas. Las diferentes cepas de *Aspergillus*, pueden tener diferentes capacidades de producir aflatoxinas, por lo que su concentración en el sobrenadante podría variar entre cepas. En este trabajo no se determinó la cantidad de micotoxina en los extractos, ni se conoce su capacidad de producirla. Con este dato sería posible incluso correlacionar el nivel de producción con la inhibición observada.
- Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la actividad amilasa podría usarse como una herramienta para la identificación de cepas productoras de micotoxinas, al comparar estos tratamientos con un control sin micotoxinas. Este tipo de ensayos podría incluso predecir si la cepa es sobreproductora de aflatoxinas al analizar el porcentaje de inhibición. Este tipo de predicción debe basarse en un estudio más detallado de la concentración de micotoxinas en el sobrenadante, entre otros parámetros.

6.- REFERENCIAS

1. Abdel, A., Carter, D., Magan, N. 2010. Temporal monitoring of the *nor1* (*afID*) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different water activity levels. *J. Appl. Microbiol.* 109(6): 1914-1922.
2. Abdin, M. Ahmad, M., Javed, S. 2010. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Arch. Microbiol.* 192: 409–425.
3. Abd-Elsalam, K., Almohimeed, I., Moslem, M., Bahkali, H. 2010. M13-microsatellite and rDNA sequence markers for identification of *Trichoderma* (Hypocreaceae) species in Saudi Arabian soil. *Genet. Mol. Res.* 9(4): 2016-2024.
4. Aljanabi, S., Martínez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic. Acids. Resarch*, 25: 4692-4693.
5. Al-Hmoud, N., Ibrahim, M., Al-Rousan, H., Alseyah, A. 2012. The Prevalence of Aflatoxinogenic *Aspergillus parasiticus* in Jordan. *Int. J. Food. Microbiol.* 1-5.
6. Akhtar, N., Shoaib, A., Awan, Z., Amin, U. 2015. First report of *Aspergillus parvisclerotigenus* Rot in garlic bulbs from Pakistan. *Plant. Dis.* 99(10): 1448.
7. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
8. Amaike, S., Keller, N. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol.* 49: 107-133.
9. Arduini, F., Errico, I., Amine, A., Micheli, L., Palleschi, G., Moscone, D. 2007. Enzymatic spectrophotometric method for aflatoxin B detection based on acetylcholinesterase inhibition. *Anal. Chem.* 79(9): 3409-3415.
10. Arduini, F., Amine, A., Moscone, D., Palleschi, G. 2010. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review). *Microchim. Acta.* 170(3-4): 193-214.
11. Arrúa, A., Moreno, E., Viay, Q., Yolanda, M., Moreno Lara, J., Vázquez, M., Flores, A. 2012. *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Rev. Mex. De Cienc. Agric.* 3(5): 1047-1052.
12. Baird, R., Trigiano, R., Windham, G., Williams, P., Kelley, R., Abbas, H. K., Scruggs, M. 2006. Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. *Mycopathologia.* 161(2): 93-99.
13. Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H., Diderichsen, B. 1992. On the Safety of *Aspergillus oryzae*: a Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:569-572.
14. Barkai-Golan, R., Paster, N. 2011. Mycotoxins in fruits and vegetables. *Academic Press.* 4692-4693.
15. Borem, A., Santos, F., Bowen, D. 2003. Understanding Biotechnology. Prentice Hall. Pearson Education, Inc.
16. Bu, R., Sathiapalan, R., Ibrahim, M., Al-Mohsen, I., Almadavar, E., Gutierrez, M., Bhatia, K. 2005. Monochrome lightcycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. Med. Microbiol.* 54: 243–248.
17. Castrillo, M., Fonseca, M., Bich, G., Jerke, G., Horianski, M., Zapata, P. 2012. Taxonomy and phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *nigri* isolated from yerba mate in Misiones (Argentina). *J. Basic Appl. Genet.* 23(2): 19-27.
18. Cooper, G. M., Hausman, R. E. 2002. La célula. 2° edición. Editorial Marbán.
19. Corvalan, A. 2002. Biología molecular en Infectología: Parte I: Desarrollo y metodologías. *Rev. Chilena. Infectol.* 19:14-24.

20. Corry, J., Curtis, G., Baird, R. 2003. Handbook of Culture Media for Food Microbiology. *Prog. Ind. Microbiol.* 37: 397-399.
21. Costa, A., Martins, M., Alves, T., Zorzete, P., Diniz, D., Correa, B. 2013. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section Flavi isolated from Brazil nuts. *Food Chem.* 139(1-4): 1127-1132.
22. Cruz, P., Buttner, M. 2008. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 100: 683-690.
23. Chang, P., Ehrlich, K., Sui-Sheng, T., Hua, S. 2006. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *Int. J. Food. Microbiol.* 108: 172-177.
24. Degola, F., Berni, E., Dall'Asta, C., Spotti, E., Marchelli, R., Ferrero, I y Restivo, F. 2007. A multiplex RT - PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 103(2), 409-417.
25. Degola, F., Berni, E., Spotti, E., Ferrero, I y Restivo, M. 2009. Facing the problem of "false positives": Re-assessment and improvement of a multiplex RT-PCR procedure for the diagnosis of *A. flavus* mycotoxin producers. *Int. J. Food. Microbiol.* 129(3):300-305.
26. Diba, K., Rahimirad, M., Makhdoomi, K., Eslamloo, M. 2014. *Aspergillus* Monitoring Project in a Large Educational Hospital Using Molecular Assay. *Afr. J. Infect. Dis.* 8(1): 1-4.
27. Divakar, P., Crespo, A., Wedin, M., Leavitt, S., Hawksworth, D., Myllys, L., Schmitt, I. 2015. Evolution of complex symbiotic relationships in a morphologically derived family of lichen-forming fungi. *New. Phytol.* 208(4): 1217-1226.
28. Divakara, S., Aiyaz, M., Moore, G., Venkataramana, M., Hariprasad, P., Nayaka, S., Niranjana, S. 2015. Analysis of genetic and aflatoxin diversity among *Aspergillus flavus* isolates collected from sorghum seeds. *J. Basic. Microbiol.* 55(11): 1255-1264.
29. Druzhinina I. C. Kubicek. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J. Zhejiang. Univ. Sci B.* 6B:100-112.
30. Edwards, S., O'callaghan, J., Dobson, A. 2002. Review, PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic, fungi. *Mycol. Res.* 106: 1005-1025.
31. El Houry, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., Lebrihi, A. 2011. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin-contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of *aflR-aflJ* Intergenic Spacer. *J. Food Sci.* 76:247-253.
32. Ezekiel, C., Atehnkeng, J., Odebode, A., Bandyopadhyay, R. 2014. Distribution of aflatoxigenic *Aspergillus* section Flavi in commercial poultry feed in Nigeria. *Int. J. Food. Microbiol.* 189: 18-25.
33. Geiser D. 2004. Practical molecular taxonomy of fungi. En: Tkacz J., Lange L. (Eds.). Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York pp 1-13.
34. Filazi, A., Sireli, U. T. 2013. Occurrence of Aflatoxins in Food. Capítulo 7. Libro en línea. Disponible en: http://cdn.intechopen.com/pdfs/38172/InTech-Occurrence_of_aflatoxins_in_food.pdf. Consultado: Abril 5 del 2013.
35. Foong-Cunningham, S., Vasavada, P., Tibor, D y Fung, D. 2007. Rapid Detection of Mycotoxigenic Molds and Mycotoxins in Fruit Juice. *Bull. Tech. Univ. Istanbul.* 54: 28-38.

36. Frisvad, J., Skouboe, P., Samson, R. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28(5): 442-453.
37. Geiser, D., Dorner, J., Horn, B., Taylor, J. 2000. The Phylogenetics of Mycotoxin and Sclerotium Production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal. Genet. Biol.* 31: 169–179.
38. Goloboff, P., Farris, J., Nixon, K. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics.* 24 (5): 774-786.
39. González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Rev. Mex. Micol.* 14: 1-21.
40. Greiner, R., Konietzny, U. 2008. Modern Molecular Methods (PCR) in Food Control: GMO, Pathogens, Species Identification, Allergens. Disponible en: <http://www.worldfoodscience.org>. Fecha de consulta: Marzo 7 del 2012.
41. Godet, M., Munaut, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. *FEMS. Microbiol. Lett.* 304(2): 157-168.
42. Guzmán, D., Peña J. 2005. Regulatory considerations of aflatoxin contamination of food in Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47(3-4):160-164.
43. Han, X., Huang, Q., Li, W., Jiang, J., Xu, Z. 2008. Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B₁ levels. *Livest Sci.* 119(1): 216-220.
44. Hatti, A., Taware, S., Taware, S., Pangrikar, P., Chavan, M., Mukadam, 2010. Genetic diversity of toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains using ISSR markers. *Int. J Curr. Res.* 5: 61-66.
45. Henry, T., Iwen, P. C., Hinrichs, S. H. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 38(4): 1510-1515.
46. Houshyarfard, M., Rouhani, H., Falahati-Rastegar, M., Malekzadeh-Shafaroudi, S., Mahdikhani-Moghaddam, E. 2015. Characterization of Iranian nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* based on microsatellite-primed PCR. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 4(1): 43-55.
47. International Food Biotechnology Council (IFBC). 1990. Safety Evaluation of Foods and Food Ingredients Derived from Microorganisms (Chapter 4). In: Biotechnologies and Food: Assuring the Safety of Foods Produced by Genetic Modification. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 12: S1 - S196.
48. Jamali, M., Karimipour, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Amani, A., Razzaghi-Abyaneh, M. 2013. Expression of aflatoxin genes *aflO* (*omtB*) and *aflQ* (*ordA*) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards. *Res. Microbiol.* 164(4): 293–299.
49. Janardhan, A., Subramanyam, D., Praveen, A., Reddi, M., Narasimha, G. 2011. Aflatoxin impacts on germinating seeds. *Ann. Biol. Res.* 2(2): 180-188.
50. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 1987. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives, 31st Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, Switzerland, February 16-25.
51. Kermani, F., Shams-Ghahfarokhi, M., Gholami-Shabani, M., Razzaghi-Abyaneh, M. 2016. Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 32(6): 1-10.

52. Kizis, D., Natskoulis, P., Nychas, G., Panagou, E. 2014. Biodiversity and ITS-RFLP Characterisation of *Aspergillus* Section Nigri Isolates in Grapes from Four Traditional Grape-Producing Areas in Greece. *PLoS ONE*. 9(4): e93923.
53. Kiyota, T., Hamada, R., Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., Mikami, S. 2011. Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the aflJ gene product. *J. Biosci. Bioeng.* 111(5): 512-517.
54. Krimitzas, A., Pyrri, I., Kouvelis, V., Kapsanaki, E., Typas, M. 2013. A Phylogenetic Analysis of Greek Isolates of *Aspergillus* Species Based on Morphology and Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences. *BioMed Res. Int.* 2013:1-18.
55. Kurtzman, C., Horn, B., Hesseltine, C. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 53(3): 147-158.
56. Latha, R., Manonmani, H., Rati, E. 2008. Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergilli*. *J. Microbiol Res.* 3: 136-142.
57. Levin, R. 2012. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *Int. J. Food. Microbiol.* 156 (1): 1-6.
58. Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D., Song, P. 2005. Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *J. AOAC. Int.* 88 (1): 136-155.
59. Maddison, W., Maddison, D. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis (version 2.5), 2008 Available at <http://mesquiteproject.org>.
60. Magan, N., Olsen, M. 2004. *Mycotoxins in food: Detection and control*. Woodhead Pub Limited.
61. Manonmani, H., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, A. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process. Biochem.* 40: 2859–2864.
62. Mateo, E., Gil-Serna, J., Patiño, B., Jiménez, M. 2011. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. *Int. J. Food. Microbiol.* 149(2): 118-126.
63. Marui, J., Ohashi-Kunihiro, S., Ando, T., Nishimura, M., Koike, H., Machida, M. 2010. Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 110(1): 8-11.
64. Midorikawa, G., Pinheiro, M., Vidigal, B., Arruda, M., Costa, F., Pappas, G. J y Miller, R. 2008. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(1): 12-18.
65. Mirhendi, H., Diba, K., Kordbacheh, P., Jalalizand, N., Makimura, K. 2007. Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR restriction enzyme method. *J. Med. Microbiol.* 56: 1568-1570.
66. Moody, B., Tyler, M. 1990. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(8): 2441–2452.
67. Moscone, D., Arduini, F., Amine, A. 2011. A rapid enzymatic method for aflatoxin B detection. *Microbial Toxins: Methods and Protocols.* 217-235.
68. Mostafa, A., Armin, A., Hamid, P., Reza, A. 2012. Rapid detection methods for analysis of fungi and mycotoxins in agriculture products. *J. Agric. Food. Chem.* 1(7):90-98.

69. Navya, H., Hariprasad, P., Naveen, J., Chandranayaka, S., Niranjana, S. 2013. Natural occurrence of aflatoxin, aflatoxigenic and nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* in groundnut seeds across India. *Afr. J. Biotechnol.* 12(19): 2587-2597.
70. Olsen, M., Johnsson, P., Möller, T., Paladino, R., Lindblad, M. 2008. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts?. *World Mycotoxin J.* 1(2): 123-126.
71. Park, J., Kim, E., Shon, D., Kim, Y. 2002. Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food. Addit. Contam.* 19(11): 1073-1080.
72. Pariza, M., Foster, E. 1983. Determining the safety of enzymes used in food processing. *J. Food. Protect.* 46:453-468.
73. Parmar, H., Sharma, P., Anerao, I., & Roy, H. 2016. Aflatoxin B1 induced developmental neurotoxicity in RIR egg. *Adv. Appl. Sci. Res.* 7(1):23-27.
74. Passone, M., Rosso, L., Ciancio, A., Etcheverry, M. 2010. Detection and quantification of *Aspergillus section flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *Int. J. Food. Microbiol.* 138(3): 276-281.
75. Patiño, B., Vázquez, C., González-Salgado, A., Gil, J y González-Jaen, M. 2007. PCR: una herramienta estratégica para la prevención de OTA en vinos. *Bull. O.I.V.* 80: 389-396.
76. Park, J., Kim, E., Shon, D., y Kim, Y. 2002. Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food. Addit. Contam.* 19(11): 1073-1080.
77. Paterson, M. 2006. Review: Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process. Biochem.* 41:1467-1474.
78. Pavón, M., García, T., Martín de Santos, R. 2008. Utilización del gen *Alt a 1* para la detección de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas mediante una técnica de PCR. *Rev. Comput. Cien. Vet.* 2: 105-113.
79. Pavone, D., Dorta B., 2015. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela. *Interciencia.* 40(1) 23-31.
80. Peña, D. 2007. La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud. Publica. Mex.* 49(3): 227-235.
81. Peterson S. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia.* 100(2): 205-226.
82. Pildain, M., Cabral, D., Vaamonde, G. 2005. *Aspergillus flavus* populations in cultivated peanut from different agroecological zones of Argentina, toxigenic and morphological characterisation. *R.I.A.* 34(3): 3-19.
83. Pitt, J., Taniwaki, M., Cole, M. 2013. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control.* 32(1): 205-215.
84. Priyanka, S., Ramana, M., Balakrishna, K., Murali, H., Batra, H. 2012. A novel non radioactive PCR-DNA probe for the detection of aflatoxin producing *Aspergillus* species from major food crops grown in India. *Adv. Microbiol.* 2: 577-586.
85. Rahimi, K.P., Sharifnabi, B., Bahar, M., 2008. Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in Iran. *J. Pathol* . 56: 15-20.

86. Rank, C., Klejnstrup, M., Petersen, L., Kildgaard, S., Frisvad, J., Gottfredsen, C., Ostefeld, T. 2012. Comparative Chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). *Metabolites*. 2 (1): 39–56.
87. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Ahmed, W., Khan A. 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics. *Pak. J. Bot.* 40: 2177-2192.
88. Rendón, N. 2009. Determinación de la presencia del gen codificador de la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* en la castaña (*Bertholletia excelsa*), mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis en línea. Disponible en: <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/236/1/T630.pdf>. Consultado: Abril 5 del 2013.
89. Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V y Garon, D. 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148: 309–320.
90. Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int. J. Food. Microbiol.* 129(2): 187-193.
91. Rodríguez-Tudela, J. L., Cuesta, I., Gómez-López, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martínez, L., & Cuenca-Estrella, M. 2008. Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26: 47-53.
92. Roseanu, A., Jecu, L., Badea, M., Evans, R. 2010. Mycotoxins: and overview on their quantification methods. *Rom. J. Biochem.* 47(1):79–86.
93. Samson, R., Visagie, C., Houbraken, J., Hong, S., Hubka, V., Klaassen, C., Perrone, G y colaboradores. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78: 141–173.
94. Sardiñas, N., Vásquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaen, M., Patino, B. 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *Int. J. Food. Microbiol.* 145: 121–125.
95. Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., Migheli, Q. 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes *aflD*, *aflO*, and *aflP* by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Int. J. Food. Microbiol.* 98: 201– 221.
96. Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Miller, A. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(16): 6241-6246.
97. Somashekar, D., Rati, E. R., Anand, S., y Chandrashekar, A. 2004. Isolation, enumeration and PCR characterization of aflatoxigenic fungi from food and feed samples in India. *Food. microbiol.* 21(6): 809-813.
98. Sooriyaamoorthy, S., Silva, K., Gunawardhane, M., Lleperuma, C. 2004. Isolation and Identification of Indigenous *Aspergillus oryzae* for Saccharification of Rice Starch. *Trop. Agri. Res.* 16:121-127.
99. Staab, J., Arunmozhi, S., Marr, K. 2009. *Aspergillus* Section Fumigati Typing by PCR-Restriction Fragment Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 47(7): 2079-2083.

100. Stark, A. 2010. Molecular Mechanism of Detection of Aflatoxins and Other Mycotoxins. In *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons* Springer Berlin Heidelberg. 21-37.
101. Tama, E., Chena, J., Laub, E., Ngana, A., Fungb, K., Leea, K., Lamc, C., Yuena, K., Laua, S., Woo, P. 2014. Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamarii* as *Aspergillus flavus*: Characterization by Internal Transcribed Spacer, β -Tubulin, and Calmodulin Gene Sequencing, Metabolic Fingerprinting, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 52(4): 1153-1160.
102. Tessari, E., Oliveira, C., Cardoso, A., Ledoux, D., Rottinghaus, G. 2006. Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. *Br. Poult. Sci.* 47: 357-364.
103. Thangaraj, M., Bhimba, V., Meenupriya, J. 2011. Phylogenetic relationship in four *Aspergillus* species based on the secondary structure of internal transcribed spacer region of rDNA. *J. of Adv. Bioinfo. Appl. Res.* 2(3): 200-205.
104. Thompson, J., Gibson, F., Plewniak, F., Higgins, J. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 4876–4882.
105. Travis, H., Iwen, P., Hinrichs, S. 2000. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 38(4):1510-1515.
106. Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6(1): 24-27.
107. Van Pamel, E., Daeseleire, E., De Clercq, N., Herman, L., Verbeken, A., Heyndrickx, M., Vlaemynck, G. 2012. Restriction analysis of an amplified rodA gene fragment to distinguish *Aspergillus fumigatus* var. ellipticus from *Aspergillus fumigatus* var. fumigatus. *FEMS Microbiol Lett.* 333(2): 153–159.
108. Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud. Mycol.* 69: 57-80.
109. White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. p 315–322.
110. Yin, Y., Lou, T., Yan, L., Michailides, T., Ma, Z. 2009. Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1857–1865.
111. Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K., Cary, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., Bennett, J. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3): 1253-1262.
112. Yu, J., Ehrlich, K. 2011. Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes. *Intech*. p 41-66.
113. Yu, J. 2012. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*. 4 (11): 1024-1057.
114. Yunus, A., Ghareeb, K., Abd-El-Fattah, A., Twaruzek, M., Böhm, J. 2011. Gross intestinal adaptations in relation to broiler performance during chronic aflatoxin exposure. *Poult. Sci.* 90(8): 1683-1689.

7.- APENDICE

APENDICE 1. Análisis de las secuencias ITS 1 e ITS2 utilizando el servicio BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Cepa TOX1-ITS1F

Aspergillus flavus strain NBMold2013A01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: KM115164.1Length: 665Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 1 to 572GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match
 Alignment statistics for match #1
 Score Identities Gaps
 1057 572/572(100%) 0/572(0%)

Query	2	TGCAGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACTCCACCCCGTGTTA	61
Sbjct	1	TGCAGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACTCCACCCCGTGTTA	60
Query	62	CTGTACCTTAGTGTCTCGGGGCCCGCCATTGATGCGCGGGGGCTCTCAGCCCG	121
Sbjct	61	CTGTACCTTAGTGTCTCGGGGCCCGCCATTGATGCGCGGGGGCTCTCAGCCCG	120
Query	122	GGCCCGCGCCCGCGGAGACACCAAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATT	181
Sbjct	121	GGCCCGCGCCCGCGGAGACACCAAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATT	180
Query	182	GTATGCAATCAGTTAAACTTTCACAAATGGATCTCTGTGTTCCGCAATCGATGAAGAA	241
Sbjct	181	GTATGCAATCAGTTAAACTTTCACAAATGGATCTCTGTGTTCCGCAATCGATGAAGAA	240
Query	242	CGCAGCGAATGCGATAACTAGTGTGAATTCAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGA	301
Sbjct	241	CGCAGCGAATGCGATAACTAGTGTGAATTCAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGA	300
Query	302	ACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGGTCATGCTGCCCC	361
Sbjct	301	ACGCACATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGGTCATGCTGCCCC	360
Query	362	ATCAGCAACGCGCTTGTGTGGTCTGCTGCCCTCTCCggggggAOCGGCCCAAG	421
Sbjct	361	ATCAGCAACGCGCTTGTGTGGTCTGCTGCCCTCTCCggggggAOCGGCCCAAG	420
Query	422	GCAGGGCGGACCCGCTCCGATCTCCGAGGATGAGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGG	481
Sbjct	421	GCAGGGCGGACCCGCTCCGATCTCCGAGGATGAGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGG	480
Query	482	CCCGCGCGGCTTGCAGAAOCGAAATCAATCTTTTTCAGGTTGACTCGGATCAGTA	541
Sbjct	481	CCCGCGCGGCTTGCAGAAOCGAAATCAATCTTTTTCAGGTTGACTCGGATCAGTA	540

Cepa TOX2-ITS1F

Aspergillus flavus strain N1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KY572367.1](#)Length: 568Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 8 to 568GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Score	Expect	Identities	Gaps	St
1037 bits(561)	0.0	561/561(100%)	0/561(0%)	PI
Query	1	GGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTACTGTAC	60	
Sbjct	8	GGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTACTGTAC	67	
Query	61	CTTAGTGTCTCGGGGCCCGCCATTGATGCGCGGGGGCTCTCAGCCCGGGCCCG	120	
Sbjct	68	CTTAGTGTCTCGGGGCCCGCCATTGATGCGCGGGGGCTCTCAGCCCGGGCCCG	127	
Query	121	CGCCCGCGGAGACACCAAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGATCG	180	
Sbjct	128	CGCCCGCGGAGACACCAAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGATCG	187	
Query	181	CAATCAGTTAAACTTTCACAAATGGATCTCTGTGTTCCGCAATCGATGAAGAACGACG	240	
Sbjct	188	CAATCAGTTAAACTTTCACAAATGGATCTCTGTGTTCCGCAATCGATGAAGAACGACG	247	
Query	241	GAAATGCGATAACTAGTGTGAATTCAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAAOCGAC	300	
Sbjct	248	GAAATGCGATAACTAGTGTGAATTCAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAAOCGAC	307	
Query	301	AITGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGGTCATGCTGCCATCAG	360	
Sbjct	308	AITGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGGTCATGCTGCCATCAG	367	
Query	361	CAOAGCTTGTGTGTTGGTCTGCTGCCCTCTCCggggggAOCGGCCCAAGGCGCG	420	
Sbjct	368	CAOAGCTTGTGTGTTGGTCTGCTGCCCTCTCCggggggAOCGGCCCAAGGCGCG	427	
Query	421	GCAGCACCCTGCTCCGATCTCCGAGGATGAGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGC	480	
Sbjct	428	GCAGCACCCTGCTCCGATCTCCGAGGATGAGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGC	487	

Cepa TOX3 ITSF

Aspergillus parvisclerotigenus strain JAPC5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KY307835.1](#) Length: 609 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 34 to 600 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps
1042 bits(564)	0.0	567/568(99%)	1/568(0%)
Query 1	AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTACTGTA	60	
Sbjct 34	AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTACTGTA	93	
Query 61	CCTTAGTTCGCTCGCGGGCCGCCAATCATGCGCCGGGGCTCTCAGCCCGGGCCC	120	
Sbjct 94	CCTTAGTTCGCTCGCGGGCCGCCAATCATGCGCCGGGGCTCTCAGCCCGGGCCC	153	
Query 121	GCGCCCGCGGACACACCAGACTCTGCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTGATTGATC	180	
Sbjct 154	GCGCCCGCGGACACACCAGACTCTGCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTGATTGATC	213	
Query 181	GCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGATCTCTTGGTCCCGCATCGATGAAGAOCGAG	240	
Sbjct 214	GCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGATCTCTTGGTCCCGCATCGATGAAGAOCGAG	273	
Query 241	CGAATCGATAACTAGTGTGAATGCGAATTCGATGAATCATGAGTCTTTGAACGCA	300	
Sbjct 274	CGAATCGATAACTAGTGTGAATGCGAATTCGATGAATCATGAGTCTTTGAACGCA	333	
Query 301	CATTGCGCCCTGTAATCCGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCCATCAA	360	
Sbjct 334	CATTGCGCCCTGTAATCCGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCCATCAA	393	
Query 361	GCAOAGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCTCCGGGGGGACGGGCCCCAAGGCAGC	420	
Sbjct 394	GCAOAGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCTCCGGGGGGACGGGCCCCAAGGCAGC	453	
Query 421	GGCGCACGCGTCCGATCCTCGAGGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGCG	480	
Sbjct 454	GGCGCACGCGTCCGATCCTCGAGGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGCG	513	

Cepa TOX4 ITS1F

Aspergillus flavus strain RG01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KX898361.1](#) Length: 1485 Number of Matches: 2
 Related Information
 Range 1: 496 to 977 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Sb Score	Expect	Identities	Gaps	Sb
PK 891 bits(482)	0.0	482/482(100%)	0/482(0%)	PK
Query 1	CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTT	60		
Sbjct 496	CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTT	555		
Query 61	TACTGTACTTAGTTCGCGGGCCGCCAATCATGCGCCGGGGCTCTCAGCCC	120		
Sbjct 556	TACTGTACTTAGTTCGCGGGCCGCCAATCATGCGCCGGGGCTCTCAGCCC	615		
Query 121	CGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGA	180		
Sbjct 616	CGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGA	675		
Query 181	TTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGATCTCTTGGTCCGCAICGATGAAG	240		
Sbjct 676	TTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGATCTCTTGGTCCGCAICGATGAAG	735		
Query 241	AACGCAGCGAAATCGATAACTAGTGTGAATGCGAATTCGATGAATCATGAGTCTTT	300		
Sbjct 736	AACGCAGCGAAATCGATAACTAGTGTGAATGCGAATTCGATGAATCATGAGTCTTT	795		
Query 301	GAAOACCAITGCGCCCTGTAATCCGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAITGCTGC	360		
Sbjct 796	GAAOACCAITGCGCCCTGTAATCCGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAITGCTGC	855		
Query 361	CCATCAAGCACGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCTCCGGGGGGACGGGCCCCAAGGCAGC	420		
Sbjct 856	CCATCAAGCACGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCTCCGGGGGGACGGGCCCCAAGGCAGC	915		
Query 421	AGGCAGCGCGGACCCGCTCCGATCCTCGAGGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGCG	480		
Sbjct 916	AGGCAGCGCGGACCCGCTCCGATCCTCGAGGTATGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCGCG	975		

Cepa TOX7 ITS1F

Aspergillus oryzae strain SCAU-F-142 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KF881768.1](#) Length: 586 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 17 to 584 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	SI
1050 bits(568)	0.0	568/568(100%)	0/568(0%)	PI
Query 1	CTGCGGAGGATCAITACCAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCAACCGTGTTT	60		
Sbjct 17	CTGCGGAGGATCAITACCAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCAACCGTGTTT	76		
Query 61	ACTGTACCTTAGTTCCTTCGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCC	120		
Sbjct 77	ACTGTACCTTAGTTCCTTCGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCC	136		
Query 121	GGCCCCGCGCCCGCGGAGACACCAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	180		
Sbjct 137	GGCCCCGCGCCCGCGGAGACACCAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	196		
Query 181	TGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA	240		
Sbjct 197	TGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA	256		
Query 241	ACGCGCGAAATGCGATAACTAGTGAATTCAGAAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTG	300		
Sbjct 257	ACGCGCGAAATGCGATAACTAGTGAATTCAGAAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTG	316		
Query 301	AACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGCGCATGCTCTCGAGCGTCATGCTGCC	360		
Sbjct 317	AACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGCGCATGCTCTCGAGCGTCATGCTGCC	376		
Query 361	CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGCTGCCCTCTCCgggggggACGGGCCCAAA	420		
Sbjct 377	CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGCTGCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAA	436		
Query 421	GGCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	480		
Sbjct 437	GGCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	496		

Cepa TOX8 ITS1F

Aspergillus flavus strain NBMold2013A01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KM115164.1](#) Length: 665 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 572 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	SI
1057 bits(572)	0.0	572/572(100%)	0/572(0%)	PI
Query 2	TGCGGAGGATCAITACCAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCAACCGTGTTA	61		
Sbjct 1	TGCGGAGGATCAITACCAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCAACCGTGTTA	60		
Query 62	CTGTACCTTAGTTCCTTCGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCC	121		
Sbjct 61	CTGTACCTTAGTTCCTTCGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCC	120		
Query 122	GGCCCCGCGCCCGCGGAGACACCAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	181		
Sbjct 121	GGCCCCGCGCCCGCGGAGACACCAGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	180		
Query 182	GTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA	241		
Sbjct 181	GTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA	240		
Query 242	CGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGAATTCAGAAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGA	301		
Sbjct 241	CGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGAATTCAGAAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGA	300		
Query 302	ACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGCGCATGCTCTCGAGCGTCATGCTGCC	361		
Sbjct 301	ACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGCGCATGCTCTCGAGCGTCATGCTGCC	360		
Query 362	ATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGCTGCCCTCTCCgggggggACGGGCCCAAA	421		
Sbjct 361	ATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGTCTGCTGCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAA	420		
Query 422	GCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	481		
Sbjct 421	GCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	480		

Cepa TOX9 ITS1F

Aspergillus oryzae strain SCAU-F-142 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: KF881768.1 Length: 586 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 17 to 584 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps
1050 bits(568)	0.0	568/568(100%)	0/568(0%)
Query 1	CTGCGAGGATCATTACCGAGGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACTCCCACCGTGTT	60	
Sbjct 17	CTGCGAGGATCATTACCGAGGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACTCCCACCGTGTT	76	
Query 61	ACTGTACCTTAGTGTCTTCGGCGGCCCGCCATTTCATGCCCCGGGGCTCTCAGCCCC	120	
Sbjct 77	ACTGTACCTTAGTGTCTTCGGCGGCCCGCCATTTCATGCCCCGGGGCTCTCAGCCCC	136	
Query 121	GGGCCCGGCCCGCGGAGACACCAAGCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	180	
Sbjct 137	GGGCCCGGCCCGCGGAGACACCAAGCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	196	
Query 181	TGTATCGCAATCAGTAAAACCTTCAACAAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGA	240	
Sbjct 197	TGTATCGCAATCAGTAAAACCTTCAACAAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGA	256	
Query 241	ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	300	
Sbjct 257	ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	316	
Query 301	AACGCACATTGGCCCCCTGGTATTCGGGGGCGATGCTGTCCGGAGCGTCAITGCTGCC	360	
Sbjct 317	AACGCACATTGGCCCCCTGGTATTCGGGGGCGATGCTGTCCGGAGCGTCAITGCTGCC	376	
Query 361	CATCAAGCACGGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCCTCTCCgggggggACGGGCCCCAAA	420	
Sbjct 377	CATCAAGCACGGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCCTCTCCGGGGGACGGGCCCCAAA	436	
Query 421	GGCAGCGCGCGCACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	480	
Sbjct 437	GGCAGCGCGCGCACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	496	

Cepa TOX10 ITS1F

Aspergillus nomius strain S1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: KJ486842.1 Length: 582 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 11 to 508 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

SI	Score	Expect	Identities	Gaps	St
PI	920 bits(498)	0.0	498/498(100%)	0/498(0%)	PI
Query 1	CTGCGAGGATCATTACCGAGGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACTCCCACCGTGTT	60			
Sbjct 11	CTGCGAGGATCATTACCGAGGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACTCCCACCGTGTT	70			
Query 61	ACTGTACCTTAGTGTCTTCGGCGGCCCGCCATTTCATGCCCCGGGGCTCTCAGCCCC	120			
Sbjct 71	ACTGTACCTTAGTGTCTTCGGCGGCCCGCCATTTCATGCCCCGGGGCTCTCAGCCCC	130			
Query 121	GGGCCCGGCCCGCGGAGACACCAAGCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	180			
Sbjct 131	GGGCCCGGCCCGCGGAGACACCAAGCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	190			
Query 181	TGTATCGCAATCAGTAAAACCTTCAACAAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGA	240			
Sbjct 191	TGTATCGCAATCAGTAAAACCTTCAACAAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGA	250			
Query 241	ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	300			
Sbjct 251	ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	310			
Query 301	AACGCACATTGGCCCCCTGGTATTCGGGGGCGATGCTGTCCGGAGCGTCAITGCTGCC	360			
Sbjct 311	AACGCACATTGGCCCCCTGGTATTCGGGGGCGATGCTGTCCGGAGCGTCAITGCTGCC	370			
Query 361	CATCAAGCACGGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCCTCTCCgggggggACGGGCCCCAAA	420			
Sbjct 371	CATCAAGCACGGCTTGTGTGGTGTGTCGTCCCTCTCCGGGGGACGGGCCCCAAA	430			
Query 421	GGCAGCGCGCGCACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	480			
Sbjct 431	GGCAGCGCGCGCACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAG	490			

Cepa TOX11 ITS1F

Aspergillus oryzae voucher ZN-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KX527867.1](#) Length: 597 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 16 to 588 [GenBankGraphics](#) | [Next Match](#) | [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps
1051 bits(569)	0.0	572/573(99%)	1/573(0%)
Query 1	CTGCGG-AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCAACTCCACCCGGTGT	59	
Sbjct 16	CTGCGGAGGAGTCAITACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCAACTCCACCCGGTGT	75	
Query 60	TACTGTACCTTAGTGTCTTCCGCGGGCCCGCACTCATGGCCCGGGGGCTCTCAGGCC	119	
Sbjct 76	TACTGTACCTTAGTGTCTTCCGCGGGCCCGCACTCATGGCCCGGGGGCTCTCAGGCC	135	
Query 120	CGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGA	179	
Sbjct 136	CGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGA	195	
Query 180	TTGTATCCCAATCAGTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAG	239	
Sbjct 196	TTGTATCCCAATCAGTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAG	255	
Query 240	AACGACGAAATGCGAATACTAGTGTGAATGCAGAAATCOSTGAATCATCGAGTCTTT	299	
Sbjct 256	AACGACGAAATGCGAATACTAGTGTGAATGCAGAAATCOSTGAATCATCGAGTCTTT	315	
Query 300	GAAAGCACATTGCGCCCTCGTATTCCGGGGGSCATGCTGTCCGAGCGTATTGCTGC	359	
Sbjct 316	GAAAGCACATTGCGCCCTCGTATTCCGGGGGSCATGCTGTCCGAGCGTATTGCTGC	375	
Query 360	CCATCAAGCACGCTTGTGTGTGGTGTGTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCCAA	419	
Sbjct 376	CCATCAAGCACGCTTGTGTGTGGTGTGTGCTCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCAA	435	
Query 420	AGGACGCGCGGACCGCGTCCGATCTCGAGGOSTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTIA	479	
Sbjct 436	AGGACGCGCGGACCGCGTCCGATCTCGAGGOSTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTIA	495	

Cepa TOX12 ITS1F

Aspergillus oryzae voucher ZN-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KX527867.1](#) Length: 597 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 23 to 597 [GenBankGraphics](#) | [Next Match](#) | [Previous Match](#)

St	Score	Expect	Identities	Gaps	St
Plk	1044 bits(565)	0.0	565/565(100%)	0/565(0%)	Pl
Query 1	AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCAACTCCACCCGGTGTACTGTA	60			
Sbjct 23	AGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCAACTCCACCCGGTGTACTGTA	82			
Query 61	CCTTAGTGTCTTCCGCGGGCCCGCACTCATGGCCCGGGGGCTCTCAGGCCCGGGCC	120			
Sbjct 83	CCTTAGTGTCTTCCGCGGGCCCGCACTCATGGCCCGGGGGCTCTCAGGCCCGGGCC	142			
Query 121	GCGCCCGCGGAGACACCGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATGATC	180			
Sbjct 143	GCGCCCGCGGAGACACCGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATGATC	202			
Query 181	GCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGAG	240			
Sbjct 203	GCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGAG	262			
Query 241	CGAAATGCGAATACTAGTGTGAATGCAGAAATCOSTGAATCATCGAGTCTTTGAACCA	300			
Sbjct 263	CGAAATGCGAATACTAGTGTGAATGCAGAAATCOSTGAATCATCGAGTCTTTGAACCA	322			
Query 301	CATTGCGCCCTCGTATTCCGGGGGSCATGCTGTCCGAGCGTATTGCTGCCATCAA	360			
Sbjct 323	CATTGCGCCCTCGTATTCCGGGGGSCATGCTGTCCGAGCGTATTGCTGCCATCAA	382			
Query 361	GCAAGGCTTGTGTGTGGTGTGTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCCAAAGGCGC	420			
Sbjct 383	GCAAGGCTTGTGTGTGGTGTGTGCTCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCGC	442			
Query 421	GGCGCACCGCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTAGGCCCGG	480			
Sbjct 443	GGCGCACCGCGTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTAGGCCCGG	502			

Cepa NTOX13 ITS1F

Aspergillus flavus strain NBMold2013A01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KM115164.1](#) Length: 665 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 1 to 571 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps
1055 bits(571)	0.0	571/571(100%)	0/571(0%)
Query 2	TGCGGAGATCAITACCAGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTA	61	
Sbjct 1	TGCGGAGATCAITACCAGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTA	60	
Query 62	CTGTACTTAGTGTCTTCGGCGGGCCGCCAATTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCG	121	
Sbjct 61	CTGTACTTAGTGTCTTCGGCGGGCCGCCAATTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCG	120	
Query 122	GGCCCGCGCCCGGAGACACACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATT	181	
Sbjct 121	GGCCCGCGCCCGGAGACACACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATT	180	
Query 182	GTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA	241	
Sbjct 181	GTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA	240	
Query 242	CGCAGCGAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTGA	301	
Sbjct 241	CGCAGCGAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTGA	300	
Query 302	ACGCACATTCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCAATGCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCC	361	
Sbjct 301	ACGCACATTCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCAATGCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCC	360	
Query 362	ATCAAGCAGCGCTTGTGTGTGGGTCTGTCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAG	421	
Sbjct 361	ATCAAGCAGCGCTTGTGTGTGGGTCTGTCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAG	420	
Query 422	GCAGCGCGGACACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTAGG	481	
Sbjct 421	GCAGCGCGGACACCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTAGG	480	

Cepa NTOX14 ITS1F

Aspergillus oryzae isolate G15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KT274812.1](#) Length: 598 Number of Matches: 1
 Related Information
 Range 1: 24 to 589 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	SI
1035 bits(560)	0.0	565/567(99%)	1/567(0%)	PI
Query 1	AGGATCATIACCAGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTACTGTA	60		
Sbjct 24	AGGATCATIACCAGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACTCCACCCGTGTTACTGTA	83		
Query 61	CCTTAGTTCCTTCGGCGGGCCGCCAATTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCC	120		
Sbjct 84	CCTTAGTTCCTTCGGCGGGCCGCCAATTCATGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCC	143		
Query 121	CGCCCGCGGAGACACACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGATC	180		
Sbjct 144	CGCCCGCGGAGACACACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGATC	203		
Query 181	GCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGACGCG	240		
Sbjct 204	GCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGACGCG	263		
Query 241	CGAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA	300		
Sbjct 264	CGAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA	323		
Query 301	CAITGGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCAATGCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCCATCAA	360		
Sbjct 324	CAITGGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCAATGCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCCATCAA	383		
Query 361	GCACGGCTTGTGTGTGGGTCTGTCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAGGCGC	420		
Sbjct 384	GCACGGCTTGTGTGTGGGTCTGTCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCAAGGCGC	443		
Query 421	GGCGCACCGGTCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTAGGCCCG	480		
Sbjct 444	GGCGCACCGGTCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCTCTGTAGGCCCG	503		

Cepa NTOX15 ITS1F

Aspergillus oryzae voucher ZN-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KX527867.1](#) Length: 597 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 24 to 588 [GenBankGraphics](#) | [Next Match](#) | [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps
1037 bits(561)	0.0	564/565(99%)	1/565(0%)
Query 1	GGATCATTACGAGTGTAGGGTTCTAGGAGCCCAACCTCCACCCCGTGTACTGTAC	60	
Sbjct 24	GGATCATTACGAGTGTAGGGTTCTAGGAGCCCAACCTCCACCCCGTGTACTGTAC	83	
Query 61	CTTAGTGTCTCGCGGGGCCGCACTCATGSCCGCGGGGCTCTCAGCCCGGGGCCG	120	
Sbjct 84	CTTAGTGTCTCGCGGGGCCGCACTCATGSCCGCGGGGCTCTCAGCCCGGGGCCG	143	
Query 121	CGCCGCGGAGACCAACCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTATGTATCG	180	
Sbjct 144	CGCCGCGGAGACCAACCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTATGTATCG	203	
Query 181	CAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGAAGAACGCAGC	240	
Sbjct 204	CAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGAAGAACGCAGC	263	
Query 241	GAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC	300	
Sbjct 264	GAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC	323	
Query 301	ATTGCGCCCTGTTGTTGGTGTGCTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCAAAGGCAGCG	360	
Sbjct 324	ATTGCGCCCTGTTGTTGGTGTGCTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCAAAGGCAGCG	383	
Query 361	CAOAGCTTGTGTGTGGTGTGCTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCAAAGGCAGCG	420	
Sbjct 384	CAOAGCTTGTGTGTGGTGTGCTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCAAAGGCAGCG	443	
Query 421	GCGGCACCGGTCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTCAACCCCTCTGTAGCCCGGC	480	
Sbjct 444	GCGGCACCGGTCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTCAACCCCTCTGTAGCCCGGC	503	

Cepa NTOX16 ITS1F

Aspergillus oryzae strain SCAU-F-142 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KF881768.1](#) Length: 586 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 17 to 584 [GenBankGraphics](#) | [Next Match](#) | [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	SI
1060 bits(568)	0.0	568/568(100%)	0/568(0%)	PI
Query 1	CTGCGGAGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCACCCCGTGT	60		
Sbjct 17	CTGCGGAGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCACCCCGTGT	76		
Query 61	ACTGTACCTTAGTGTCTTGGCGGGCCCGCACTCATGSCCGCGGGGCTCTCAGCCCG	120		
Sbjct 77	ACTGTACCTTAGTGTCTTGGCGGGCCCGCACTCATGSCCGCGGGGCTCTCAGCCCG	136		
Query 121	GGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	180		
Sbjct 137	GGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTAT	196		
Query 181	TGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGAAGAAC	240		
Sbjct 197	TGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGAAGAAC	256		
Query 241	ACGCGAGCAATGCGATAACTAGTGTGAATGCGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	300		
Sbjct 257	ACGCGAGCAATGCGATAACTAGTGTGAATGCGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	316		
Query 301	AAGCACAATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGCTCGAGCGTCAATGCTGCC	360		
Sbjct 317	AAGCACAATTGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGCTCGAGCGTCAATGCTGCC	376		
Query 361	CATCAAGCACGGCTTGTGTGGTGTGCTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCAAAG	420		
Sbjct 377	CATCAAGCACGGCTTGTGTGGTGTGCTGCTCCCTCTCCggggggACGGGCCCAAAG	436		
Query 421	GCGAGCGCGGACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTCAACCCCTCTGTAG	480		
Sbjct 437	GCGAGCGCGGACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTCAACCCCTCTGTAG	496		

Cepa NTOX17 ITS1F

Aspergillus oryzae strain SCAU-F-142 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KF881768.1](#) Length: 586 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 17 to 584 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	SI
1050 bits(568)	0.0	568/568(100%)	0/568(0%)	PI
Query 1	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTTT	60		
Sbjct 17	CTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTTT	76		
Query 61	ACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCAIGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCC	120		
Sbjct 77	ACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCAIGGCCGCGGGGCTCTCAGCCCC	136		
Query 121	GGGCCCCGCGCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGAT	180		
Sbjct 137	GGGCCCCGCGCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGAT	196		
Query 181	TGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA	240		
Sbjct 197	TGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA	256		
Query 241	ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGTCAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	300		
Sbjct 257	ACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGTCAGAAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTG	316		
Query 301	AACGCACATGCGCCCCCTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCC	360		
Sbjct 317	AACGCACATGCGCCCCCTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAITGCTGCC	376		
Query 361	CATCAAGCAGCGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGCCCCCTCCgggggggACGGGCCCAAA	420		
Sbjct 377	CATCAAGCAGCGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGCCCCCTCCGGGGGGACGGGCCCAAA	436		
Query 421	GGCAGCGCGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAG	480		
Sbjct 437	GGCAGCGCGCGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAG	496		

APENDICE 2. Análisis estadísticos de las determinaciones de actividad amilasa

Cepa 1

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Cepa1 by Trata1

Trata1	Mean Rank	Sample Size
0	5.5	2
1	8.5	4
2	2.5	4
Total	5.5	10

Kruskal-Wallis Statistic 7.9024

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0192

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	72.0000	36.0000	25.2	0.0006
Within	7	10.0000	1.4286		
Total	9	82.0000			

Total number of values that were tied 2

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 10 Missing Cases 0

Statistix 8.0

analisis nuevo legna, 09/02/2017, 19:43:24

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Cepa1 by Trata1

Trata1	Mean	Homogeneous Groups
1	8.5000	A
0	5.5000	AB
2	2.5000	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.394

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Cepa 2.

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Cepa2 by Trata2

Trata2	Mean Rank	Sample Size
0	5.5	2
1	8.0	3
2	2.5	4
Total	5.0	9

Kruskal-Wallis Statistic 7.0000

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0302

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	52.5000	26.2500	21.0	0.0020
Within	6	7.5000	1.2500		
Total	8	60.0000			

Total number of values that were tied 0

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 9 Missing Cases 1

Statistix 8.0

analisis nuevo legna, 09/02/2017, 19:44:38

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Cepa2 by Trata2

Trata2	Mean	Homogeneous Groups
1	8.0000	A
0	5.5000	AB
2	2.5000	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.394

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.