

Aspergillus aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual*

Alfatoxigenic *Aspergillus*: current taxonomic focus

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga¹, Ernesto Moreno Martínez², Martha Yolanda Quezada Viay², Josefina Moreno Lara², Mario Ernesto Vázquez Badillo³ y Alberto Flores Olivas^{1§}

¹Departamento de Parasitología Agrícola y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro Núm. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila. C. P. 25315. Tel. 01 844 110226. (afloooli@uaaan.mx), (aaarrua@gmail.com). ²Unidad de Investigación en Granos y Semillas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú S/N, Colonia Atlámica, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Tel.: 01 55 58809316. (ernesto@unam.mx), (viayy@hotmail.com), (joslara2004@hotmail.com). ³Departamento de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro Núm. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila. C. P. 25315. (mario59ernesto@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: afloooli@uaaan.mx.

Resumen

Aspergillus es un género estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro y efectos en la salud. Su identificación a nivel de género es relativamente sencilla, pero a nivel de especies se complica debido a las similitudes existentes entre las mismas. Debido a esto, actualmente, los taxónomos recomiendan un enfoque polifásico que comprende no sólo características morfológicas, sino también bioquímicas y moleculares. El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar los aspectos básicos concernientes a la identificación polifásica de estas especies.

Palabras clave: *Aspergillus*, identificación, enfoque polifásico.

Debido a la presencia de patógenos con potencial micotoxígeno, ocurren año tras año, importantes pérdidas, directas e indirectas, de productos alimentarios, a nivel de campo, de poscosecha y de anaquel, con las consecuentes restricciones en exportación, destrucción de productos contaminados, muerte de animales y en casos extremos de seres humanos. Según la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), las pérdidas mundiales de

Abstract

The genus *Aspergillus* has been studied for centuries due to its industrial and deterioration properties, and its effects on health. Its identification at a genus level is relatively simple, yet at a level of species it becomes more complicated, due to the similarities between both. Due to this, taxonomists currently recommend a polyphasic focus that includes, not only morphologic characteristics, but also biochemical and molecular characteristics. The aim of this investigation was to present the basic aspects concerning the polyphasic identification of these species.

Key words: *Aspergillus*, identification, polyphasic focus.

Due to the presence of pathogens with a mycotoxigenic potential, important direct and indirect losses of food products occur each year in the field, post-harvest and on the shelf, with consequent export restrictions, destruction of contaminated products, death of animals, and in extreme cases, of humans. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), world losses of food products due to mycotoxins are of around 1 billion tons a year (AGNS, 2010). In the mycotoxins, the most important are aflatoxins (AF), due to their toxicity and

productos alimenticios debidas a micotoxinas son del orden de 1 000 millones de toneladas al año (AGNS, 2010). Dentro de las micotoxinas, se destacan las aflatoxinas (AF) por su toxicidad y potencial cancerígeno. Por estas razones el estudio de los hongos aflatoxígenos adquiere cada vez mayor importancia. Es imperioso adquirir herramientas para la correcta identificación de los mismos, dado el riesgo que su presencia implica.

***Aspergillus* y aflatoxinas**

Aspergillus se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose aislar de una extensa gama de sustratos; ha sido estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro, biotecnológicas y efectos negativos en la salud humana y animal. La identificación a nivel de género es sencilla mediante características morfológicas; sin embargo, a nivel de especies se complica. La taxonomía de *Aspergillus*, se fundamenta hasta el siglo pasado, en características fenotípicas. En la actualidad se recomienda el llamado enfoque polifásico, basado en la utilización de caracteres morfológicos en combinación con características bioquímicas y moleculares para dar perfiles de especies mucho más detallados (Klich y Samson, 2007). Aproximadamente 50 nuevas especies de *Aspergillus* fueron descritas a partir de 2000, basándose en características morfológicas y moleculares siendo muchas de ellas imposibles de diferenciar morfológicamente (Klich, 2009). Numerosas especies importantes de *Aspergillus* se hallan descritas en bases de datos como Mycobank.org o Index Fungorum. Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus*, *A. parasiticu* y *A. nomius*, aunque se conocen otras. La aflatoxina B₁ es la sustancia con potencial cancerígeno más elevado que existe en la naturaleza (Perrone *et al.*, 2007), siendo *A. flavus* la especie más común asociada a su contaminación.

Diversidad de *Aspergillus* y producción de toxinas

La diversidad genética dentro de poblaciones de *A. flavus* ha sido ampliamente estudiada en relación con su potencial de producción de aflatoxinas y su relación con las variantes morfológicas L (400µm o más) y S (menores a 400µm) denominadas así de acuerdo al tamaño de los esclerocios que producen (Perrone *et al.*, 2007). En laboratorio, en medios de cultivo, los aislamientos de suelo de cepas tipo S, producen niveles más altos de aflatoxinas (Perrone *et*

carcinogenous potential. For these reasons, the study of the aflatoxigenic fungi becomes more and more important. It is crucial to acquire tools to correctly identify them, given the risk implied by their presence.

***Aspergillus* and aflatoxins**

Aspergillus is widely distributed in nature, and can be isolated from a wide variety of substrates. It has been studied for centuries due to its industrial and deterioration properties, and its negative effects on human and animal health. Identification at a genus level is simple using morphological characteristics, yet at a level of species it becomes more complicated. The taxonomy of *Aspergillus*, was supported, until last century, on phenotypic characteristics. The polyphasic focus, based on the use of morphologic characteristics, combined with biochemical and molecular characteristics is currently recommended to present much more detailed profiles of species (Klich and Samson, 2007). Approximately 50 new species of *Aspergillus* were described since they year 2000, based on morphological and molecular characteristics, most of which are impossible to differentiate morphologically (Klich, 2009). Several important species of *Aspergillus* are described in databases such as Mycobank.org or Index Fungorum. The main species that produce aflatoxins are *Aspergillus flavus*, *A. parasiticu* and *A. nomius*, although others are known. Aflatoxin B₁ is the substance with the highest carcinogenic potential known in nature (Perrone *et al.*, 2007), with *A. flavus* as the substance most commonly related to its pollution.

Diversity of *Aspergillus* and production of toxins

The genetic diversity in *A. flavus* populations has been widely studied in relation to its production of aflatoxins and its relation to morphological variants L (400µm or more) and S (lower than 400µm), named in this way due to the size of the sclerotia they produce (Perrone *et al.*, 2007). In the laboratory, in culture mediums, the soil isolations of S strains produce higher levels of aflatoxins (Perrone *et al.*, 2007). The synthesis of aflatoxins and its precursory metabolites is also related to greater production of conidia (Wilkinson *et al.*, 2004).

Studies on the biodiversity of the toxigenic species of *Aspergillus* are useful to clarify the molecular, biochemical and environmental characteristics of the different species in relation to their adaptation to different environmental end geographical conditions, as well as their potential for

al., 2007). La síntesis de aflatoxinas y sus metabolitos precursores se asocia también a una mayor producción de conidios (Wilkinson *et al.*, 2004).

Estudios sobre la biodiversidad de las especies de *Aspergillus* toxigénas son útiles para aclarar molecular, bioquímica y ecológicamente las características de las diferentes especies en relación con su adaptación a diferentes condiciones ambientales y geográficas, así como su potencial de toxigenicidad (Samson *et al.*, 2007). Cinco de los seis subgéneros de *Aspergillus* incluyen una o más especies que producen un teleomorfo, y muchos más que no lo hacen (Samson *et al.*, 2007). Las relaciones teleomorfo - anamorfo de *Aspergillus* son complejas. La evidencia molecular hasta la fecha indica que todas estas están filogenéticamente relacionadas (Peterson, 2000). Sin embargo, los teleomorfos y anamorfos de *Aspergillus* son muy distintos entre sí, tanto en la morfología como en la fisiología (Samson *et al.*, 2007). La presencia de un teleomorfo es un importante indicador de la fisiología, capacidad de descomposición y potencial para la producción de micotoxinas. En aquellas especies cuyos teleomorfos no se conocen, las mismas son llamadas por sus anamorfos (Pitt y Samson, 2007).

Identificación de los *Aspergillus*-enfoque polifásico

En 1965, Rapper y Fennell, publicaron el libro, “The genus *Aspergillus*”, básico para la identificación de estos hongos durante la mayor parte del siglo pasado, fundamentado en el uso de características morfológicas en medios diferenciales a temperaturas establecidas. Dicha publicación, aceptaba 132 especies subdivididas en 18 grupos. Actualmente, se consideran más de 180 especies anamórficas aceptadas, que presentan teleomorfos en 9 géneros diferentes. *Aspergillus* se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos (Samson y Pitt, 2000).

La forma de encarar la taxonomía de estos hongos ha variado hasta el punto de que la sola morfología, tradicional, ni las herramientas moleculares, tan actuales, utilizadas de manera independiente son suficientes, es necesario combinarlas tomando también en cuenta la fisiología y bioquímica de cada una, para realizar perfiles detallados, sobre todo si se considera describir nuevas especies. Apesar de que los datos de secuencias de ADN son extremadamente útiles para el reconocimiento de límites de las especies, no existen criterios estrictos en cuanto a dónde trazar la línea entre las especies filogenéticas y de poblaciones que son potencialmente capaces de cruzarse (Geiser *et al.*, 2007).

toxigenicity (Samson *et al.*, 2007). Five of the six subgenera of *Aspergillus* include one or more species that produce a teleomorph, and many more that do not (Samson *et al.*, 2007). The teleomorph - anamorph relations of *Aspergillus* are complex. The molecular evidence up to date indicates that all these are phylogenetically related (Peterson, 2000). However, *Aspergillus* teleomorphs and anamorphs present many differences between them, both in morphology and physiology (Samson *et al.*, 2007). The presence of a teleomorph is an important indicator of the physiology, capability of decomposition and potential for the production of mycotoxins. In species with unknown teleomorphs, these are named after their anamorphs (Pitt and Samson, 2007).

Identification of the *Aspergillus*-polyphase focus

In 1965, Rapper and Fennell, published the book, “The genus *Aspergillus*”, basic for the identification of these fungi during most of last century, supported on the use of morphological characteristics in differential media at established temperatures. This publication, accepted 132 species, subdivided into 18 groups. Currently, over 180 anamorphic species are accepted, which display teleomorphs in 9 different genera. *Aspergillus* is subdivided into 7 subgenera which divide into groups (Samson and Pitt, 2000).

The way to approach these fungi has varied to the point in which neither the traditional morphology alone, nor the current molecular tools, used independently, are enough. They must be combined, also taking into account the physiology and the biochemistry of each, to create detailed profiles, especially when describing new species. Despite the DNA sequence data being extremely useful to recognize the limits between species, there are no strict criteria regarding where to draw the line between the phylogenetic species, and those of populations that are potentially capable of breeding (Geiser *et al.*, 2007).

To identify species of *Aspergillus*, it is currently recommended to examine several gene sequences (ITS, calmodulin, β -tubulin, actin) and then compare the results obtained with sequences stored in well-known databases. However, ITS's frequently show little or no variation between closely related species. For metabolites produced by these fungi, it is recommended to analyze 4-8 compounds instead of just one molecule. The most appropriate thing to do would be to avoid using mycotoxins as a criterion for separating species, since they could or could not be produced by these fungi (Samson *et al.*, 2007).

En el caso de *Aspergillus*, para identificar especies, actualmente, se recomienda examinar varias secuencias de genes (ITS, calmodulina, β -tubulina, actina) y posteriormente comparar los resultados obtenidos con secuencias almacenadas en bases de datos reconocidas. Sin embargo, los ITS con frecuencia muestran poca o ninguna variación entre especies estrechamente relacionadas. En cuanto a metabolitos producidos por estos hongos, se recomienda el análisis de 4-8 compuestos en lugar de una sola molécula. Lo más adecuado sería no utilizar micotoxinas como criterio de separación de especies, porque las mismas pueden o no ser producidas por estos hongos (Samson *et al.*, 2007).

Características morfológicas utilizadas en la identificación de especies

Los criterios morfológicos utilizados para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* y sus telomorfos, se basan en la utilización de medios de cultivo diferenciales y temperaturas de incubación que permitan el desarrollo de características útiles en su identificación (Rodríguez *et al.*, 2007). 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 (Rodríguez *et al.*, 2007).

Características bioquímicas utilizables en la identificación de especies

Los perfiles de metabolitos secundarios pueden ser estudiados por medio de cromatografía gaseosa (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), espectrometría de masas; las proteínas de interés pueden ser separadas por electroforesis de Gel 2D o electroforesis capilar. Como los perfiles de crecimiento y proteínas requieren infraestructura de baja tecnología estas características podrían ser muy útiles para determinar la identidad de un aislado (Frisvad *et al.*, 2007). Hay información disponible en www.aspergillus.uk/metabolites/list que cita metabolitos secundarios producidos por especies potencialmente micotoxigénas y que podrían utilizarse en su identificación.

Morphological characteristics used to identify species

The morphological criteria used for the classification of species of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs are based on the use of differential culture media and incubation temperatures that help the development of characteristics which may be useful for their identification (Rodríguez *et al.*, 2007). The main macro and microscopic characteristics used in the classification of species of these fungi include the diameter of the colonies; color of their front and rear; the presence of sclerotia, drops of exudate and diffusible pigment; texture of the colonies, disposition of the metulae or phialides on the vesicle; measurements of the stipes, vesicles, metulae and phialides; ornaments and colors of the conids, of the Hülle cells, and the ascospores (Rodríguez *et al.*, 2007).

Biochemical characteristics usable in the identification of species

The profiles of the secondary metabolites may be studied using gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC), or mass spectrometry; proteins of interest may be separated by 2D Gel electrophoresis or capillary electrophoresis. Since the growth and protein profiles require low-technology infrastructure, these characteristics could be very useful to determine the identity of an isolate (Frisvad *et al.*, 2007). Information is available in (www.aspergillus.uk/metabolites/list), which names secondary metabolites produced by potentially mycotoxigenic species and that could be used in their identification.

Molecular criteria to be considered in the identification of *Aspergillus* species

Some techniques for the molecular characterization of *Aspergillus* are truly promising. These include the microsatellite length polymorphisms (MLP); the short tandem repeats (STR) (De Valk *et al.*, 2005); the amplified fragment length polymorphisms (AFLP) (De Valk *et al.*, 2007); the multilocus sequence typing (MLST) (Bain *et al.*, 2007) and the codification of tandem repetitions (CTR) (Balajee *et al.*, 2007).

When selecting the analysis method, it is recommended to choose it according to the exact reason of the characterization of strains and the available technical resources (Frisvad *et al.*, 2007). For the polyphasic identification of the species

Crerios moleculares a ser tomados en cuenta en la identificación de especies de *Aspergillus*

Existen técnicas realmente prometedoras para la caracterización molecular de *Aspergillus*. Entre ellas se encuentran los polimorfismos de la longitud de microsátélites (MLP); las repeticiones cortas en tándem (STR) (De Valk *et al.*, 2005); polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (De Valk *et al.*, 2007); los tipificados de secuencias de multilocus (MLST) (Bain *et al.*, 2007) y la codificación de repeticiones de tándem (CTR) (Balajee *et al.*, 2007). Se recomienda la selección del método de análisis de acuerdo a la razón exacta de la caracterización de las cepas y a los recursos técnicos disponibles (Frisvad *et al.*, 2007). Para la identificación polifásica de los *Aspergillus*, a nivel de especie, pueden utilizarse además las regiones del DNA que se encuentran dentro del rDNA, específicamente ITS1 e ITS2, y las regiones variables del extremo 5' del gen 28S (región D1-D2) y los genes de la vía de biosíntesis de las AF han sido estudiados y secuenciados y los mismos también pueden utilizarse en procesos de identificación.

Dado el peligro que representan estos patógenos para la salud humana y las pérdidas económicas que las toxinas derivadas de los mismos pueden causar, es de suma importancia el conocimiento de las pautas marcadas para su correcta identificación. Actualmente, se recomienda un enfoque polifásico para la identificación y caracterización de especies de *Aspergillus* incluyendo características moleculares, morfológicas, ecológicas y datos fisiológicos, especialmente si se describen nuevas especies.

Literatura citada

- Bain, J. M.; Tavanti, A.; Davidson, A. D.; Jacobsen, M. D.; Shaw, D.; Gow, N. A. and Odds, F. C. 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 45:1469-1477.
- Balajee, S. A.; Tay, S. T.; Lasker, B. A.; Hurst, S. F. y Rooney, A. P. 2007. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. Eukaryotic Cell. 6:1392-1399.
- of *Aspergillus*, the regions of DNA found in the rDNA can also be used, specifically ITS1 and ITS2, and the variable regions of the 5' end of the gene 28S (region D1-D2) and the genes of the way of biosynthesis of the AF have been studied and sequenced and they can also be used in the identification processes.
- Given the dangers of these pathogens for human health, and the economic losses this can entail, knowledge on the guidelines for their proper identification is crucial. A polyphasic focus is recommended for the identification and characterization of species of *Aspergillus* is recommended, including molecular, morphological and environmental characteristics, along with physiological data, especially if new species are described.
- End of the English version
-
- De Valk; H. A.; Meis, J. F. G. M.; De Pauw, B. E.; Donnelly, P. J. and Klaassen, C. H. W. 2007. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 45:1415-1419.
- De Valk, H. A.; De Meis, J. F. G. M.; Curfs, I. M.; Muehlethaler, K.; Mouton, J. W. a Klaassen, C. H. W. 2005. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution ndfingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. J. Clin. Microbiol. 43:4112-4120.
- Frisvad, J. C.; Larsen, T. O.; De Vries, R.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Cabañes, F. G.; Ehrlich, K. and Samson, R. A. 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. Studies Mycol. 59:31-37.
- Geiser, D. M.; Klich, M. A.; Frisvad, J. C.; Peterson, S. W.; Varga, J. and Samson, R. A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Studies Mycol. 59:1-10.
- Klich, M. A. and Samson, R. A. 2007. *Aspergillus* reference cultures. International Commission on *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA). Disponible en: <http://www.aspergilluspenicillium.org/ASPREFINTRO.htm>.
- Klich, M. 2009. Health effects of *Aspergillus* in food and air. Toxicol ind health. 9(25):657-667.

- Perrone, G.; Susca, A.; Cozzi, G.; Erlich, K.; Varga, J.; Frisvad, J. C.; Meijer, M.; Noonim, P.; Warapa, M. and Samson, R.A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. 2007. *Studies Mycol.* 59:53-66.
- Peterson, S. W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. *In: Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification.* (Samson RA, Pitt JI, (Eds.) Amsterdam (NL): Harwood Academic Publishers: 323-355.
- Pitt, J. I. and Samson, R. A. 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies Mycol.* 59:67-70.
- Rodríguez, P.; Soares, C.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.; Lima, N. and Venâncio, A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* Méndez-Vilas (Eds.). 527-534 pp.
- Rodríguez, P.; Venancio, A.; Kozakiewicz, Z. and Lima, N. 2007. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. *Int. J. Food Microbiol.* 129:187-193.
- Samson, R.A.; Varga, J.; Witiak, S. M. and Geiser, D. M. 2007. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies Mycol.* 59:71-73.
- Samson, R. and Pitt, J. 2000. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. CRC PRESS. 510 p.
- Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (AGNS). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2010. Micotoxinas. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/agns/chemicals_mycotoxins_es.asp.
- Wilkinson, H.; Ramaswamy, A.; Sim, S. C. and Keller, N. P. 2004. Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia.* 96:1190-1198.