



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

---

---

**COMPETENCIA DE CEPAS de *Aspergillus flavus*  
Link. PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS  
DE AFLATOXINAS EN PLANTAS DE  
CACAHUATE (*Arachis hypogaea* L).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÍCOLA**

**P R E S E N T A:**

**PRISCILA ANAID RIVERA CRUZ**

**ASESOR:**

**M. EN C. MA. DEL YAZMÍN CUERVO USÁN**

**CO-ASESOR:**

**DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

**Competencia de Cepas de Aspergillus flavus Link Productoras y no Productoras de Aflatoxinas en Plantas de Cacahuete (Arachis hypogaea L.)**

Que presenta la pasante: **PRISCILA ANAID RIVERA CRUZ**  
Con número de cuenta: **40801884-7** para obtener el Título de: **Ingeniera Agrícola**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de mayo de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.C. María del Yazmín Cuervo Usán	
<b>VOCAL</b>	M.C. María Cristina Julia Pérez Reyes	
<b>SECRETARIO</b>	Ing. Arturo Leodegario Ortiz Cornejo	
<b>1er SUPLENTE</b>	Dra. Martha Yolanda Quezada Viay	
<b>2do SUPLENTE</b>	M.C. Josefina Moreno Lara	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).  
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.  
(Art 127 REP)

IHM/ntm\*

## DEDICATORIA

---

A mis padres, por brindarme el apoyo y todo el esfuerzo que me ofrecieron durante todos estos años me sirvió de impulso, para ser tan dedicada, responsable en mi vida y poder cumplir mis metas, los amo infinitamente y con todo mi corazón, a ellos les dedico este gran logro y que es el principio de muchos más que están por venir. A mis hermanos por todo su cariño, siempre me he esforzado por ser un ejemplo en su vida y espero haberlo logrado.

Mis tíos y primas que al inicio de esta gran aventura que fue ingresar a una carrera universitaria, siempre han estado para apoyarme y no solo aquí, siempre espero contar con ustedes.

A mi asesora la M. C. Maria del Yazmin Cuervo Usan por ser tan linda maestra, por haber puesto en el camino a tan bellas personas y mis ángeles, la Dra. Martha Yolanda Quezada Viay y a la M. C. Josefina Moreno Lara por su paciencia, dedicación y el haberme compartido sus conocimientos, las quiero y admiro, a ustedes se los dedico, fue un placer y todo un gusto conocerlas y contar con su amistad.

Mis maestros de la carrera que en ellos encontré una figura de superación y de que uno debe luchar constantemente por lo que quiere. A mis amigos Dulce, Héctor, David, Nancy y Vale por ayudarme al inicio del proyecto y apoyarme en la culminación del trabajo, nunca olvidare cuales fueron las primeras palabras que están anotadas y la famosa "Bitácora del capitán" los quiero y admiro, gracias por seguir formando parte de mi vida valoro su amistad y por formar parte de tan bellos recuerdos y lo más importante que es formar parte de tan maravillosa mi amada carrera de Ingeniería Agrícola.

## **RECONOCIMIENTO**

---

A la Unidad de Granos y Semillas (UNIGRAS) por el apoyo brindado en la elaboración del proyecto, ya que en sus instalaciones se llevó a cabo el desarrollo del trabajo.

Agradezco a la Dra. Martha Yolanda Quezada Viay y a la M. M. Josefina Moreno Lara, por el apoyo brindado, por ser mis guías en el trabajo de tesis, las asesorías y enseñanzas que me compartieron a lo largo de los años en los que se realizó en trabajo son para mi invaluable y de so estoy muy agradecida.

A mis asesores M. C. María del Yazmín Cuervo Usán, M.C. Maria Cristina Julia Pérez Reyes y Ing. Arturo Leodegario Ortiz Cornejo.

Agradezco a la Universidad me siento muy orgullosa de formar parte de una de las mejores universidades y haberme formado como profesionalista.

A mis profesores de la Carrera de Ingeniería Agrícola, personas que sembraron en mí esa pasión por la carrera y seguir trabajando para que los éxitos que nosotros logremos son por ellos y para ellos.

Muchas gracias a todas las personas que confiaron en mí para la elaboración del trabajo.

# ÍNDICE

	Pág.
Índice de figuras .....	iv
Índice de tablas .....	vi
RESUMEN .....	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos particulares .....	3
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>4</b>
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
4.1. Generalidades del cacahuete ( <i>Arachys hypogaea</i> L.) .....	6
4.1.1. Origen geográfico .....	6
4.1.2. Clasificación taxonómica .....	6
4.1.3. Morfología .....	6
4.1.4. Condiciones edafoclimáticas .....	8
4.1.5. Producción mundial y nacional .....	9
4.1.6. Usos .....	10
4.2. Prácticas del cultivo de cacahuete .....	11
4.2.1. Preparación del suelo .....	11
4.2.2. Siembra .....	11
4.2.3. Manejo del cultivo .....	12
4.2.4. Fertilización .....	12
4.2.5. Plagas en el cultivo de cacahuete .....	13
4.2.6. Enfermedades en cacahuete .....	14
4.2.7. Cosecha y beneficio .....	15
4.3. Generalidades de <i>Aspergillus</i> .....	16
4.3.1. Taxonomía del género <i>Aspergillus</i> .....	16
4.3.2. Morfología del género <i>Aspergillus</i> .....	17
4.3.3. Importancia de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	18
4.3.3.1. Características morfológicas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> .....	19

4.4. Micotoxinas .....	21
4.5. Aflatoxinas. ....	22
4.6. Legislación de las aflatoxinas.....	23
4.7. Métodos inmunoquímicos aplicados en la cuantificación de micotoxinas.....	25
4.8. Prácticas para la prevención y reducción de la contaminación de cacahuete por aflatoxinas. ....	27
4.9. Técnicas del manejo integrado de plagas y enfermedades .....	34
4.10. Importancia del control biológico.. ....	35
4.10.1. Control biológico de hongos fitopatógenos.....	36
4.11. Control biológico en México.....	39
4.12. Programa de Arizona con la cepa AF36 no toxígena .....	41
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	42
5.1. Obtención de cepas de <i>Aspergillus flavus</i> y/o <i>A. parasiticus</i> no toxígenas.....	43
5.1.1. Productos de cacahuete.....	43
5.1.2. Aislamiento de <i>Aspergillus Secc. Flavi</i> a partir de las muestras de cacahuete .	44
5.1.3. Aislamiento de <i>Aspergillus Secc. Flavi</i> a partir de suelo .....	44
5.1.4. Obtención de las colonias de cultivos monospóricos .....	45
5.1.5. Aislamientos axénicos e identificación de <i>Aspergillus Secc. Flavi</i> aislados de cacahuates .....	45
5.1.6. Desarrollo de cepas de <i>Aspergillus Secc. Flavi</i> en medio de cultivo .....	46
5.1.7. Cuantificación de la producción de aflatoxinas totales en medio PDA de las cepas aisladas.....	47
5.2. Fase experimental <i>in vitro</i> .....	48
5.2.1. Material biológico de la prueba <i>in vitro</i> .....	48
5.2.2. Contenido de humedad .....	48
5.2.3. Suspensión de esporas para inocular las semillas de cacahuete .....	49
5.2.4. Diseño experimental de prueba <i>in vitro</i> .....	49
5.2.5. Inóculo de la prueba <i>in vitro</i> .....	50
5.2.6. Cuantificación de aflatoxinas totales por columnas de anticuerpos monoclonales de prueba <i>in vitro</i> en las semillas de cacahuete.....	50
5.3. Fase experimental en invernadero .....	52

5.3.1. Material biológico de la prueba en invernadero .....	52
5.3.2. Prueba de germinación de cacahuete.....	52
5.3.3. Siembra de plantas de cacahuete .....	52
5.3.4. Suspensión de esporas para inocular las plantas de cacahuete.....	53
5.3.5. Diseño experimental en invernadero .....	53
5.3.6. Inoculación de las plantas con los tratamientos.....	54
5.3.7. Determinación de aflatoxinas por la prueba de ROSA® FAST Aflatoxin Quantitative CHARM SCIENCES, INC.....	54
5.3.8. Determinación de fenoles totales.....	55
5.3.9. Análisis estadístico .....	56
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
6.1. Descripción de las especies de <i>Aspergillus Secc. Flavi</i> encontradas en los productos de cacahuete.....	58
6.1.1. <i>Aspergillus flavus</i> Link.....	58
6.1.2. Resultados de la cuantificación de aflatoxinas de las cepas aisladas de las muestras de cacahuete. ....	62
6.2. Fase experimental <i>in vitro</i> .....	63
6.2.1. Invasión de <i>A. flavus</i> en las semillas de cacahuete <i>in vitro</i> .....	63
6.2.2. Cuantificación de aflatoxinas totales por columnas de anticuerpos monoclonales en cacahuates inoculados de la prueba <i>in vitro</i> .....	65
6.3. Fase experimental en invernadero .....	66
6.3.1. Caracterización de plantas de cacahuete inoculadas en invernadero .....	66
6.3.2. Peso fresco de plantas y frutos del cacahuete inoculadas en invernadero.....	67
6.3.3. Peso seco las plantas y frutos de cacahuates inoculadas en invernadero .....	70
6.3.4. Cuantificación de aflatoxinas totales por la prueba de ROSA® FAST Aflatoxin Quantitative CHARM SCIENCES, INC en los cacahuates inoculados en invernadero .....	72
6.3.5. Determinación de fenoles totales de los frutos de cacahuete en seco. ....	73
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>

X. ANEXOS .....	86
-----------------	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Planta de cacahuete .....	7
<b>Figura 2.</b> Semillas de cacahuete maduro .....	16
<b>Figura 3.</b> Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Características de la macromorfología y micromorfología de <i>Aspergillus</i> .....	19
<b>Figura 5.</b> Colonia de <i>A. flavus</i> .....	20
<b>Figura 6.</b> Conidióforo de <i>Aspergillus flavus</i> .....	20
<b>Figura 7.</b> Micotoxinas comunes en alimentos y granos .....	21
<b>Figura 8.</b> Estructura química de las principales aflatoxinas .....	22
<b>Figura 9.</b> Técnicas de manejo integrado de plagas y enfermedades.....	34
<b>Figura 10.</b> Catarina depredadora “Vedalia” <i>Rodolia cardinalis</i> (Mulsant).....	35
<b>Figura 11.</b> Concepto de control biológico de enfermedades vegetales .....	36
<b>Figura 12.</b> Desarrollo tecnológico para la comercialización de control biológico de fitopatógenos .....	38
<b>Figura 13.</b> Material biológico, productos comerciales de cacahuete.....	43
<b>Figura 14.</b> Cultivos monospóricos: 1) Método de diluciones y 2) Punta de hifa.. .....	45
<b>Figura 15.</b> Distribución de colonias en tres puntos equidistantes. ....	46
<b>Figura 16.</b> Preparación de medio de cultivo PDA.....	46
<b>Figura 17.</b> Columnas de anticuerpos monoclonales (AflaTest®). ....	47
<b>Figura 18.</b> Material biológico, semilla de cacahuete.....	48
<b>Figura 19.</b> Diseño experimental de la fase <i>in vitro</i> .....	50
<b>Figura 20.</b> Extracción de aflatoxinas totales: Izq. Filtrado del extracto. Der. Bombas con la columna de inmunoafinidad AflaTest® .....	51
<b>Figura 21.</b> Izq. Invernadero de UNIGRAS. Der. Unidades experimentales, macetas .....	52
<b>Figura 22.</b> Sustrato combinación peat-moss/tepojal.....	53
<b>Figura 23.</b> Diseño experimental en invernadero.....	54
<b>Figura 24.</b> Prueba de ROSA® FAST aflatoxin quantitative CHARM SCIENCES, INC..	55
<b>Figura 25.</b> <i>Aspergillus flavus</i> : Colonias de A) CYA25, B) MEA, C) CYA37, D) PDA, 7 días de incubación. ....	59

<b>Figura 26.</b> Producción de aflatoxinas en productos de cacahuate .....	62
<b>Figura 27.</b> Cajas de Petri con semillas inoculadas .....	64
<b>Figura 28.</b> Producción de aflatoxinas en cacahuates <i>in vitro</i> con <i>A. flavus</i> .....	65
<b>Figura 29.</b> Altura de las plantas de cacahuete inoculadas con <i>A. flavus</i> en invernadero....	66
<b>Figura 30.</b> Pesos fresco de las plantas de cacahuete inoculadas con <i>A. flavus</i> en invernadero .....	67
<b>Figura 31.</b> Plantas de cacahuete en invernadero.....	68
<b>Figura 32.</b> Pesos fresco de los frutos de cacahuete producidos en plantas inoculadas con <i>A. flavus</i> en invernadero .....	68
<b>Figura 33.</b> Frutos de cacahuete cosechados.....	69
<b>Figura 34.</b> Pesos seco de las plantas de cacahuete inoculadas con <i>A. flavus</i> en invernadero .....	70
<b>Figura 35.</b> Pesos seco de frutos de cacahuete producidos en plantas inoculadas con <i>A. flavus</i> en invernadero .....	70
<b>Figura 36.</b> Peso seco de cacahuates cosechados.....	71
<b>Figura 37.</b> Producción de aflatoxinas en cacahuates de plantas inoculadas en invernadero con <i>A. flavus</i> .....	72
<b>Figura 38.</b> Fenoles totales en cacahuates de plantas inoculadas con <i>A. flavus</i> .....	73
<b>Figura 39.</b> Coloración de cacahuates molidos para la determinación de fenoles totales ...	74

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales países productores de cacahuete con cáscara.....	9
<b>Tabla 2.</b> Producción agrícola nacional de cacahuete; Modalidad: riego y temporal. ....	10
<b>Tabla 3.</b> Composición química promedio de la semillas de cacahuete .....	11
<b>Tabla 4.</b> Límites de aflatoxinas en alimentos para animales permitidos .....	23
<b>Tabla 5.</b> Límites permitidos por la FDA de los E. U. para aflatoxinas en alimentos .....	24
<b>Tabla 6.</b> Reglamento técnico MERCOSUR sobre los límites máximos de aflatoxinas .....	24
<b>Tabla 7.</b> Límites máximos admitidos de aflatoxinas por la Unión Europea.....	24
<b>Tabla 8.</b> Métodos de detección de micotoxinas.....	26
<b>Tabla 9.</b> Buenas prácticas agrícolas (BPA) para cacahuete.....	27
<b>Tabla 10.</b> Buenas prácticas de fabricación (BPF) para cacahuete.....	31
<b>Tabla 11.</b> Componentes del control biológico.....	37
<b>Tabla 12.</b> Medición de estructuras micromorfológicas de <i>A. flavus</i> .....	58
<b>Tabla 13.</b> Escala de severidad de <i>A. flavus</i> en las semillas de cacahuete inoculadas .....	60

## RESUMEN

---

Las pudriciones y el deterioro de los granos, cereales, oleaginosas y leguminosas, son causadas por hongos que se desarrollan en el campo, cosecha, almacenamiento y transporte. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, pueden colonizar las semillas de varios cultivos agrícolas, incluido el cacahuete, dando como resultado su contaminación con aflatoxinas (Moreno-Martínez, 1988). La contaminación con estos metabolitos secundarios tóxicos es severa en el cultivo de cacahuete que se encuentra bajo condiciones de estrés por sequía. Estas micotoxinas pueden causar enfermedades teratogénicas y cancerígenas en humanos y animales que las consumen en granos contaminados. El objetivo de este trabajo fue aplicar un biocontrol para la prevención de la contaminación con aflatoxinas en plantas de cacahuete *Arachis hypogaea*. Semillas procedentes de San Nicolás de las Flores, Jalostotitlán, Jalisco, sembradas en bolsas con 5 kg de sustrato (peat-moss y tepojal) en invernadero. Una vez establecidas las plántulas, el sustrato se inoculó con cepas de: a) *A. flavus* altamente productor de toxinas (cepa UNIGRAS-28); b) *A. flavus* no toxígena (cepa UNIGRAS-3) como biocontrol; c) combinación de ambas cepas; y d) agua destilada, como testigo. Cabe mencionar que las muestras que se utilizaron de semillas de cacahuete y productos comerciales se encontraban contaminadas con *A. flavus*. Las plantas se desarrollaron en el invernadero en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) ubicado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, hasta su ciclo de fructificación, para evaluar sintomatología y características fisiológicas de las plantas, y determinar los niveles de aflatoxinas en los frutos.

Se encontró como resultado que los niveles de aflatoxinas en los frutos del cacahuete de plantas inoculadas con *A. flavus* UNIGRAS-3 fueron menores en comparación con los niveles de aflatoxinas en el testigo sin inocular. Así mismo, en semillas inoculadas con *A. flavus* UNIGRAS-28 la cantidad de aflatoxinas fue estadísticamente igual al del testigo sin inocular, al de *A. flavus* UNIGRAS-3 y a la combinación de ambas cepas. En las plantas en que se aplicó el biocontrol *A. flavus* UNIGRAS-3 se obtuvo mayor cantidad de frutos, plantas con buenas características fisiológicas y los niveles de aflatoxinas fueron menores, y con la inoculación de la cepa UNIGRAS-28 se obtuvieron menos frutos, se observaron malformaciones en los tallos y las aflatoxinas no disminuyeron. En conclusión, *A. flavus*

UNIGRAS-3 disminuyó los niveles de aflatoxinas en el cultivo, funcionando como biocontrol de cepas productoras de aflatoxinas bajo las condiciones establecidas en este trabajo.

## I. INTRODUCCIÓN

---

El fruto del cacahuete *Arachis hypogaea* L., tiene gran demanda por el hombre ya que lo consume de manera directa sin cáscara, tostado y salado; en forma de subproductos en crema y en confitería. En México representa una de las botanas más consumidas. El follaje se usa como subproducto en forma de forraje, en la alimentación de animales. Esta planta se originó en América del Sur, y hoy en día es cultivada a nivel mundial (Robles-Sánchez, 1990). En 2014 se cultivaron en México un total de 59,415 hectáreas con una producción de 96,346 toneladas en promedio anual (SIAP, 2014), de acuerdo con datos del cierre agrícola. Los principales estados productores son Sinaloa, Puebla, Chiapas, Oaxaca y Chihuahua, que en conjunto acumulan 84% de la superficie dedicada a este cultivo.

En condiciones de estrés, la planta de cacahuete es susceptible a la penetración por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, y a la contaminación posterior de los frutos con aflatoxinas. Estos hongos son comunes en los cacahuates y pueden ser productores o no productores de aflatoxinas (Mehl *et al.*, 2012). Éstas son metabolitos secundarios los cuales pueden tener efectos cancerígenos y hepatotóxicos en seres vivos expuestos con alimentos contaminados en el campo o en el almacenamiento. De las cuatro aflatoxinas principales (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>), la B<sub>1</sub> es la que se presenta en mayores concentraciones, ya que es un compuesto biológicamente más activo en comparación con las otras. Las aflatoxinas son comunes en un número importante de alimentos destinados a la alimentación humana y animal, como el maíz y el cacahuete. Los niveles de aflatoxinas permitidos en cereales y en cacahuates deben ser menores a las 20 ppb para consumo humano (NOM-188-SSA1-2002).

*A. flavus* infecta con frecuencia a los cacahuates y granos de maíz cuando están aún en el campo, y su incidencia aumenta cuando los granos son dañados por insectos u otros agentes patógenos, así como por las pudriciones del tallo, sequía, daño foliar severo, inundaciones y por otras situaciones de estrés a las que están sometidas las plantas (Moreno-Martínez, 1988).

El control biológico es un método de manejo de plagas y enfermedades en campo, que usa organismos antagonistas para reducir la presencia de patógenos que sean dañinos y provoquen enfermedades en los cultivos (Cook y Baker, 1983).

En campos de Arizona, U. E. se ha realizado la aplicación de una cepa no toxígena de *A. flavus* como biocontrol de cepas de esta misma especie nativas de suelos destinadas al cultivo del algodón para prevenir o disminuir la contaminación de las semillas con aflatoxinas. Sin embargo no se tienen reportes de este método de biocontrol en plantas de cacahuete, ni tampoco se ha experimentado la eficacia de cepas no toxígenas de *A. flavus* como organismos biocontroladores en México.

Por lo que en este trabajo se evaluó una cepa de *A. flavus* no toxígena como biocontrol para prevenir la contaminación del fruto de cacahuete con aflatoxinas.

## II. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo general

- Evaluar una cepa de *Aspergillus flavus* L. no toxígena, como un agente potencial de biocontrol para la prevención de contaminación con aflatoxinas en plantas de cacahuete, *in vitro* como en condiciones de invernadero.

### 2.2. Objetivos particulares

- Identificar cepas de *A. flavus* no toxígenas procedentes de semillas de cacahuete, que pudieran ser utilizadas como agentes de biocontrol.
- Analizar el nivel de aflatoxinas que produce la cepa toxígena en semillas de cacahuete inoculados *in vitro* en presencia de una cepa no toxígena.
- Analizar el nivel de aflatoxinas totales que produce la cepa toxígena en plantas de cacahuete inoculadas en condiciones de invernadero en presencia de una cepa no toxígena.
- Comparar el efecto fitotóxico de la cepa no aflatoxígena en semillas y plantas de cacahuete.

### III. HIPÓTESIS

---

- Si se realiza la inoculación en suelo de una cepa no toxígena de *A. flavus* como organismo antagonista de cepas productoras de aflatoxinas, entonces por competencia entre ambas se podrá prevenir o reducir la contaminación de aflatoxinas en semillas y plantas de cacahuete.

# IV. ANTECEDENTES

---



Elaboración propia, 2016.

## IV. ANTECEDENTES

---

### 4.1. Generalidades del cacahuete (*Arachis hypogaea* L.)

#### 4.1.1. Origen geográfico

El cacahuete o maní es una fuente importante de aceite vegetal y de proteínas, en las zonas tropicales y subtropicales. Es originario de América del Sur. De allí se distribuyó a los países del Lejano Oriente, a África, al resto de América y a Europa (Durán *et al.*, 2011).

#### 4.1.2. Clasificación taxonómica

El cacahuete pertenece a la familia **Leguminosae**, subfamilia **Papilionidae** y género **Arachis**. La especie cultivada es ***Arachis hypogaea* L.** Ésta compuesta de dos grupos principales de variedades: erectas y rastreras. Casi todas las variedades comerciales son de porte erecto (Robles, 1980).

#### 4.1.3. Morfología

El cacahuete es una planta herbácea anual y de corta estatura, mide de 25 a 30 cm de altura con las siguientes características morfológicas (Figura 1) (Sánchez, 1992):

1. **Raíces.** Las plantas están formadas por una raíz principal pivotante que origina un gran número de raíces secundarias. Éstas a su vez producen raicillas absorbentes que forman una densa red. Al igual que en las demás plantas leguminosas, en sus raíces se originan nódulos por la presencia de bacterias nitrificantes.
2. **Tallo.** En la mayoría de las variedades comerciales el tallo es erecto. Puede alcanzar una altura de 15 a 70 cm. Produce ramas desde la base. Estas pueden originar raíces cuando tocan el suelo. El tallo es ligeramente pubescente.
3. **Hojas.** Son pinnadas con dos pares de folíolos ovalados, obtusos o ligeramente puntiagudos, con márgenes lisos, y de 4 a 8 cm de largo. Tienen en la base del peciolo dos hojuelas o estípulas angostas, alargadas y puntiagudas.
4. **Flores.** Se originan, agrupadas, en yemas axilares. Al principio las flores son sésiles. La corola es de color amarillo brillante y de 0.9 a 1.4 cm de diámetro, formada por un estandarte grande frecuentemente con manchas moradas y alas libres de la quilla, que es

puntiaguda. Tiene nueve estambres alrededor del ovario alargado. Comúnmente, las flores se autopolinizan.

Después de la fertilización, el pedicelo de la flor se alarga, convirtiéndose en un tallito o estaquilla, de 3 a 10 cm de longitud. Gradualmente, empuja el ovario o fruto joven dentro del suelo, en donde éste completa su desarrollo.

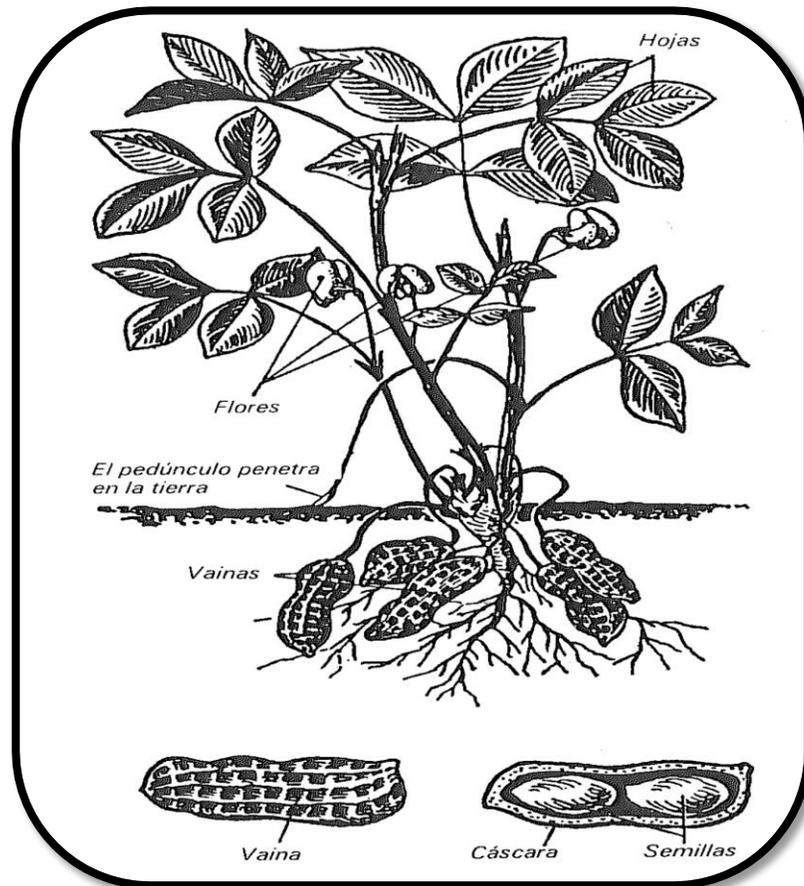


Figura 1. Planta de cacahuete.

Fuente: Sánchez, 1992.

5. **Fruto.** Es una vaina o cápsula de 2 a 7 cm de largo, con dos o cuatro semillas. En variedades erectas, las vainas se forman alrededor del tallo, pero en las rastreras están muy esparcidas. Se encuentran enterradas de 3 a 10 cm bajo la superficie del suelo. Las vainas son abultadas, de color café amarillento, con bordes prominentes reticulados y más o menos estrechos entre las semillas.
6. **Semillas.** Son ligeramente redondeadas y comprimidas, con hilio puntiagudo. Tienen una testa más o menos gruesa, algo reticulada, de color rojo claro oscuro. Poseen dos cotiledones blancos de aspecto aceitoso.

La planta de cacahuete tiene una vida anual, con tallos rastreros vellosos de entre 25 a 50 cm de altura. Los frutos del cacahuete están envueltos en una cáscara o vaina coriácea que generalmente tiene dos semillas cubiertas de una película delgada, poseen un sabor muy agradable y tienen un alto valor nutritivo una vez tostadas (SIAP, 2014).

#### **4.1.4. Condiciones edafoclimáticas**

##### ❖ Clima

El cacahuete prospera en climas cálidos, es susceptible de heladas, se desarrollan adecuadamente en temperaturas que varían entre 21 y 27 °C, pues a 12°C su crecimiento se detiene, a 30°C aumenta considerablemente la transpiración y puede deshidratarse. Los suelos deseables para la siembra de esta oleaginosa son permeables, sueltos, profundos y sin agua freática en 1 m de profundidad (Robles, 1980).

Exige buena luminosidad ya que necesita de esta para alcanzar su desarrollo normal y propiciar un buen contenido de aceite en las semillas. Por ello, debe evitarse en su cultivo la presencia de otras plantas que le produzcan sombra (Sánchez, 1992).

Las lluvias a intervalos frecuentes lo benefician en su ciclo vegetativo, pero pueden dañarlo si se presenta al tiempo de la formación y maduración de las vainas. Una precipitación de 300 a 500 mm, con lluvias bien distribuidas durante su ciclo vegetativo, es suficiente para asegurar una buena cosecha. Hasta el momento de la floración, a los 30 a 40 días, requiere humedad moderada. De la floración hasta la maduración inicial, a los 40 a 50 días, exige mayor humedad. Durante el periodo final de maduración, 20 a 30 días, necesita muy poca humedad. La recolección debe coincidir con tiempo seco (Robles, 2002).

##### ❖ Suelo

Debe procurarse que el suelo sea suelto, preferentemente franco-arenoso, sin cascajo o piedras, y sin residuos vegetales en la superficie. La profundidad deseable para el buen desarrollo de las raíces y de los frutos es de 20 a 50 cm de suelo, y de 50 a 90 cm de subsuelo bien drenado. Esto último, al igual que la topografía plana, es importante pues el cacahuete se perjudica con los encharcamientos (Robles, 2002).

Un pH entre 5.8 y 6.2 es el más favorable. Este también es aconsejable para otros cultivos como algodón, maíz, ajonjolí y sorgo, con los cuales puede rotarse. El pH por debajo de 5.8 puede ser perjudicial para el establecimiento de las bacterias nitrificantes. En este caso, hay necesidad de encalar el suelo, pues el calcio es un elemento muy importante para el cacahuete (Sánchez, 1992).

#### 4.1.5. Producción mundial y nacional

De acuerdo con datos del anuario de producción a nivel mundial en toneladas, se mencionan los países que producen más cacahuates con cáscara (Tabla 1):

**Tabla 1. Principales países productores de cacahuete con cáscara.**

Posición	Región	Producción (1000\$ Int)	Producción (Ton)
1	China	7,388,368	16,800,000
2	India	2,452,413	5,779,000
3	Nigeria	1,308,585	3,070,000
4	Estados Unidos de América	1,334,413	3,057,850
5	Myanmar	551,522	1,371,500
6	República Unida de Tanzania	348,380	810,000
7	Indonesia	315,292	712,874
8	Argentina	299,808	685,722
9	Senegal	285,484	672,803
10	Camerún	242,354	570,000

Fuente: FAO, 2012.

El principal productor de cacahuates en el mundo es China con 39% de la producción mundial, seguido de la India, Nigeria con 19.9% y Estados Unidos 5%; México aporta sólo 0.02% a nivel mundial (FAO, 2012).

La producción mundial de cacahuates es de 35.9 millones de toneladas anualmente, que equivale a 25.7 millones de toneladas de cacahuete sin cáscara; de las que se exporta alrededor de 8.1%. México produce 60, 000 toneladas anuales aproximadamente, exporta 11, 000 toneladas e importa 111, 000 toneladas. En México, el cacahuete se cultiva principalmente en alrededor de 62, 000 hectáreas, con una producción promedio anual de 60, 000 toneladas, con un valor de 653 millones de pesos (Tabla 2). Se cultiva principalmente en los estados de Sinaloa, Puebla, Chiapas, Oaxaca,

Chihuahua y San Luis Potosí, que en conjunto acumulan 84% de la superficie dedicada a este cultivo (SIAP, 2014).

**Tabla 2. Producción agrícola nacional de cacahuete. Ciclo: cíclicos y perennes.  
Modalidad: riego y temporal.**

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)
Sinaloa	19,955.81	19,672.60	27,638.76	1.4
Puebla	6,776.60	6,775.60	8,591.92	1.27
Chiapas	6,581.00	6,581.00	12,015.63	1.83
Oaxaca	6,271.10	6,271.10	10,263.83	1.64
Chihuahua	6,149.75	6,149.75	17,579.65	2.86
San Luis Potosí	3,360.00	3,360.00	3,787.80	1.13
Guerrero	2,677.50	2,637.50	4,541.33	1.72
Sonora	1,088.81	1,028.81	1,053.07	1.02
Morelos	965.11	965.11	1,933.68	2
Michoacán	910.5	910.5	1,483.20	1.63

Fuente: SIAP (2014).

#### 4.1.6. Usos

La planta de cacahuete se aprovecha para el consumo en forma integral. El cacahuete o maní tiene gran demanda para su consumo directo después de su tostado, se usa para confiterías, para la preparación de pan, galletas, ensaladas, etc.; y es una fuente importante de aceite para consumo humano en diferentes ingredientes, para crema, margarina e inclusive en jabonería fina, cosméticos, entre otros (SIAP, 2014). Se utiliza desde la semilla hasta el follaje, usándose como subproducto en forma de heno, como forraje fresco o ensilado para el ganado. Su introducción a la industria alimenticia se ha basado en su contenido de proteínas, aceites, carbohidratos, sustancias albuminoideas y compuestos vitamínicos con alto contenido de complejo B (Robles, 1980).

**Tabla 3. Composición química promedio de la semilla de cacahuete.**

<b>Humedad</b>	6%
<b>Proteína</b>	30%
<b>Aceite</b>	45%
<b>Fibra cruda</b>	3%
<b>Extracto libre de nitrógeno</b>	13%
<b>Ceniza</b>	3%

Fuente: Sánchez, 1992. Elaboración propia (2016).

Desde luego, existe variación en los análisis reportados en diversos países debido a variedades, a condiciones ecológicas y edáficas, y a las prácticas de cultivo que se ejecutan durante el ciclo vegetativo de las plantas de cacahuete (Sánchez, 1992).

## **4.2. Prácticas del cultivo de cacahuete**

### **4.2.1. Preparación del suelo**

Para la preparación del terreno, se recomienda una aradura primaria profunda, de aproximadamente 30 cm, y una secundaria, para dejar bien mullida la capa superficial del suelo y facilitar la germinación de las semillas. En esta labor, es muy importante eliminar las malezas y enterrar bien los residuos vegetales, pues si quedan superficiales, pueden favorecer enfermedades por hongos y, por lo tanto, dificultarse la siembra.

Es conveniente nivelar el terreno para evitar encharcamientos; facilitar el drenaje; favorecer una distribución uniforme del agua de riego, y obtener una profundidad uniforme de siembra (INIFAP, 2005).

### **4.2.2. Siembra**

El uso de una buena semilla es básico para lograr una alta población de plantas y obtener una producción satisfactoria. Debe preferirse semilla certificada que asegure pureza varietal, viabilidad y sanidad. Es más práctica la siembra de semilla desgranada, preferentemente a mano, que la siembra de semilla con cáscara (Sánchez, 1992).

La siembra debe realizarse al inicio de la época de lluvias, de tal manera que la cosecha coincida con la época de sequía.

La profundidad de la siembra depende del tipo de suelo y de su contenido de humedad. En suelos sueltos, se recomienda una profundidad de 4 a 7 cm, y en suelos más pesados, de 3 a 5 cm. Las mayores profundidades corresponden a suelos secos. Lo ideal es sembrar en suelos húmedos, pues así la semilla germina más rápido y uniformemente (INIFAP, 2005).

La densidad de siembra difiere de acuerdo a las variedades y su hábito de crecimiento. Para variedades de porte erecto pueden usarse dos semillas por sitio, distanciadas de 30 a 40 cm, sembradas en surcos separados entre sí de 40 a 50 cm (INIFAP, 2005).

#### **4.2.3. Manejo del cultivo**

La semilla germina cuatro o cinco días después de la siembra. A los 30 a 35 días, los pedicelos de las flores fertilizadas comienzan a alargarse y enterrarse, y se inicia la formación de los frutos. El periodo comprendido entre estas dos etapas es el más crítico en lo referente a la competencia por malezas. El control de éstas puede lograrse mediante uno o dos pasos con la cultivadora. Tan pronto como los peciolos de las flores se alarguen, deben suspenderse todas las labores de cultivo (INIFAP, 2002).

Con un ciclo de lluvias de dos y medio a tres meses, generalmente no se necesita riego, si la siembra se hace oportunamente. Si se presentan periodos intermedios de 15 y más días de sequía, debe aplicarse agua suplementaria al cultivo. El agua que se utilice no debe ser salina, ni tener en suspensión materiales orgánicos. La pendiente debe ser uniforme para evitar erosión y encharcamientos. Los surcos de riego, en suelos sueltos, no deben ser más largos de 100 m. Al tiempo de la maduración de los frutos, debe suspenderse el riego (Robles, 1990).

#### **4.2.4. Fertilización**

El cacahuete consume grandes cantidades de nitrógeno, pero por ser una leguminosa, las bacterias nitrificantes de sus raíces le proveen a la planta la mayor parte de sus requerimientos. Por ello, puede prosperar en suelos arenosos, pobres en nitrógeno, siempre y cuando éstos tengan una buena provisión de bacterias nitrificantes específicas para él, los requerimientos en fósforo son bajos y,

cuando se rota con otros cultivos que han sido fertilizados o el suelo tiene mediano contenido de ese elemento, no hay necesidad de aplicarlo.

El cacahuate exige altas cantidades de potasio. El mejor método de suministrarlo es aplicándolo al cultivo precedente con el cual se rota, o incorporándolo al suelo uno o dos meses antes de la siembra. Cuando el potasio queda en la superficie, alrededor de las cápsulas, éstas tienden a absorberlo en mayor cantidad que al calcio, lo que origina la producción de cápsulas en las vainas (INIFAP, 2005).

El calcio, al igual que el potasio, es un elemento muy importante en la nutrición del cacahuate. El calcio debe estar disponible en la zona de las raíces durante todo el periodo de crecimiento, y en la zona de las cápsulas, durante el periodo de su formación y maduración. La zona de fructificación requiere más calcio que la zona de las raíces y esta, a su vez, debe disponer de mayor cantidad de potasio que la zona en donde se desarrollan los frutos (INIFAP, 2005), consume grandes cantidades de magnesio. La aplicación de yeso, que es un sulfato de calcio y de magnesio, suministra ambos elementos. La deficiencia de manganeso puede presentarse cuando el pH es superior a 6.2. Esto se manifiesta por un amarillamiento de las hojas más tiernas, circunscrito a los espacios intervenales. Para corregir esta anomalía se recomienda aplicar 25 kg/ha de sulfato de manganeso (Robles, 1990).

La rotación del cacahuate con otros cultivos presenta varias ventajas. Por ser una planta leguminosa, incorpora al suelo, en sus residuos de cosecha, buena cantidad de nitrógeno. Cuando el cultivo anterior se fertiliza, el cacahuate aprovecha con mayor eficiencia los residuos de dicha fertilización que de una fertilización directa, especialmente en lo que se refiere al potasio (INIFAP, 2002).

#### **4.2.5. Plagas en el cultivo de cacahuate**

Las plagas más importantes que afectan el cacahuate son los gusanos comedores de hojas. Entre éstos pueden mencionarse el gusano soldado (*Spodoptera exigua*) y el falso medidor (*Trichoplusia ni*).

Comúnmente, estos insectos tienen enemigos naturales. En cuanto sea posible, debe evitarse el uso de insecticidas para su control. El uso de productos químicos solo se justifica en caso de ataques severos. Deben preferirse los insecticidas estomacales sin efecto residual prolongado. Las

aplicaciones deben hacerse solo hasta 15 días antes de la cosecha, particularmente cuando se utilice el follaje para su ensilado (INIFAP, 2002).

#### 4.2.6. Enfermedades en cacahuete

Las enfermedades más importantes son (Sánchez, 1992):

- **Pudrición de las semillas y de las plántulas o pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*).** Es causada por varias especies de hongos. Atacan principalmente las semillas deterioradas y las plántulas cuya emergencia se demora, debido a siembras profundas, temperatura baja y exceso de humedad. La afección puede prevenirse empleando semilla seleccionada y tratada con fungicidas protectores.
- **Pudrición negra de la base del tallo (*Sclerotium rolfsii*).** Afecta el tallo en la zona del cuello, Las condiciones secas y la alta temperatura del suelo favorecen la enfermedad. Por eso, en estos casos no se aporca el cultivo, pues este puede provocar una mayor susceptibilidad de la planta a esta enfermedad.
- **Manchas foliares (*Cercospora* o *peca*).** Son de color amarillo pálido y con el tiempo se tornan de color marrón rojizo o negro en el envés de la hoja, y de color marrón claro en el haz. Las manchas aparecen rodeadas por un halo amarillo, son pequeñas y circulares. En otro caso, las manchas son de color marrón oscuro o negro en ambos lados de la hoja, de tamaño más pequeño y no presentan halo. Si se requiere, pueden hacerse aspersiones con fungicidas protectores del follaje.
- **Marchitez o tizón (*Sclerotinia minor*).** Invade los tejidos de la base del tallo, ocasionando su pudrición. Como consecuencia de ello, la planta se marchita y se seca. Cuando la humedad del suelo es alta, se forman esclerocios pequeños, redondos, de color crema, sobre la superficie de los tejidos invadidos. El exceso de humedad en el suelo, favorece el desarrollo de la enfermedad.
- **Chahuixtle o roya (*Puccinia arachidis*).** Afecta principalmente las hojas inferiores. Aparecen en el haz manchas irregulares cloróticas, que en el envés son de color marrón claro y de aspecto pulverulento.

- **Nematodos.** La planta de cacahuete puede ser atacada por varias clases de nematodos, como los que producen nudos radicales y el nematodo de la pradera. Afectan las raíces y los frutos y ocasionan su pudrición o malformación. Su control se efectúa mediante la rotación de cultivos.
- **Enanismo.** El virus causa una marcada reducción en el crecimiento y escaso número de frutos con semillas de mala calidad.
- **Pudrición de los frutos y semillas.** Durante el desarrollo de los frutos y de las semillas, varios hongos pueden ocasionar su deterioro. Los factores que favorecen la infección son exceso de humedad y temperaturas altas del suelo.

#### 4.2.7. Cosecha y beneficio

Para determinar la época de cosecha, se arrancan varias plantas por surcos para observar si la mayor parte de las vainas están maduras. Las semillas maduras deben ser de color rosado o rojo, (Figura 2) deben despegarse internamente de la vaina y su testa se desprende fácilmente. Si se obtiene 75% o 80% de frutos maduros, el cacahuete estará listo para su cosecha. Esto coincide con el amarillamiento de las plantas (INIFAP, 2002).

La cosecha puede realizarse en forma manual, semimecanizada o mecanizada, dependiendo de la superficie del cultivo. En la cosecha manual se arrancan las plantas y agrupan en montones pequeños, alineados, para que el sol las termine de secar. Luego, se separan los frutos y se someten a otro periodo de secado al sol (Robles, 1980).

El arranque a mano solo se justifica en cultivos pequeños, de tipo familiar. Es laborioso y debe realizarse con cuidado, a fin de aprovechar todos los frutos formados.

Para el desgrane y almacenamiento, la semilla de cacahuete debe tener un porcentaje de humedad de 8 a 10%. El desgrane consiste en la rotura de las cápsulas para separar las semillas. Esta labor se realiza mecánicamente (Durán, A., 2011).

El rendimiento promedio del cacahuete es de 25% a 30 % de cáscara, y de 70% a 75% de semilla. Puede haber diferencias de acuerdo a las variedades. Si la semilla va a utilizarse para la siembra, debe almacenarse en bodegas con adecuada ventilación, y previamente tratarse con insecticidas o con bromuro de etileno. Si el periodo de almacenamiento va a ser largo, debe almacenarse con la cáscara, pues así se conserva mejor y pierde menos rápido su viabilidad. Ésta puede durar hasta 2 años, en buenas condiciones de almacenamiento (SIAP, 2014).



**Figura 2. Semillas de cacahuete maduro.**

Fuente: <http://www.adelgaceenlinea.com/wp-content/uploads/MANI.jpg>

Si la semilla va a usarse en la industria de alimentos, para la obtención de aceite y de pasta, no debe tratarse con insecticidas. La extracción del aceite se efectúa usando el método combinado de extracción con expulsor y con disolventes, o el prensado continuo por medio de expulsos (SIAP, 2014).

### **4.3. Generalidades del género *Aspergillus***

Las especies del género *Aspergillus* siempre han estado presentes en el ambiente, pero fue hasta 1729 que Micheli distinguió las estructuras tales como estípites y las cabezas de esporas. El observó que las cadenas de esporas en columnas o radiadas surgen de una estructura central similar al aspergillum o hisopo usado para rociar agua bendita en el catolicismo, de aquí el nombre de *Aspergillus* utilizado para estos hongos.

#### **4.3.1. Taxonomía del género *Aspergillus***

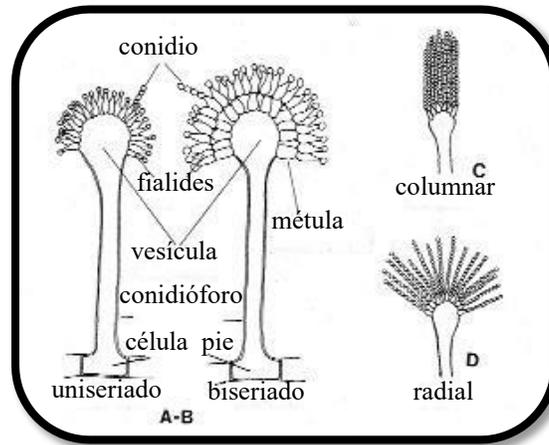
Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos.

Raper y Fennell (1965) en su texto “*The genus Aspergillus*” reconocían en esta monografía 132 especies subdivididas en 18 grupos. Actualmente, se consideran más de 180 especies anamórficas aceptadas, que corresponden a 9 géneros de *Ascomycota* por su estado teleomorfo. *Aspergillus* se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos (Samson y Pitt, 2000).

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). Cinco de los seis subgéneros de *Aspergillus* incluyen una o más especies que presentan un estado teleomorfo, y muchos más que no lo hacen. Las relaciones teleomorfo - anamorfo de *Aspergillus* son complejas. La evidencia molecular hasta la fecha indica que todas las especies 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. La presencia de un teleomorfo es un importante indicador de la fisiología, capacidad de descomposición y un factor potencial para la producción de micotoxinas (Samson *et al.*, 2007).

#### **4.3.2. Morfología del género *Aspergillus***

*Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas llamadas fiálides a partir de las cuales se forman las esporas asexuales llamadas conidios (Figura 3). El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estípite o conidióforo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las fiálides, en muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células estériles denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas.



**Figura 3. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. A-B: conidióforos; C-D: Cabezas conidiales.**

**Fuente: Klich y Samson, 1996.**

#### 4.3.3. Importancia de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*

Dentro de los hongos de importancia causantes del deterioro de una amplia variedad de productos alimenticios como frutas y hortalizas, semillas, granos entre otros se encuentran los del género *Aspergillus*; siendo de particular interés *A. flavus* y *A. parasiticus*.

*A. flavus* y *A. parasiticus*, además de ser hongos saprófitos, son patógenos oportunista de plantas, insectos, vertebrados e inclusive de animales domésticos y humanos. En los campos agrícolas, durante condiciones de sequía y temperaturas altas, las poblaciones de *A. flavus*, se incrementan sobre los restos del cultivo, sobre los tejidos maduros o muertos y sobre material vegetativo dañado, lo que permite ser una fuente de inóculo. La asociación de *A. flavus* con el cultivo puede iniciar desde la madurez, cosecha y hasta el almacén. Asimismo, la fuente de inóculo de infección inicial puede ser interrumpida. El proceso de contaminación puede ser dividido en dos fases: una ocurre durante la maduración del cultivo y la segunda después de la maduración. En la madurez, los cultivos son susceptibles a la infección por *A. flavus* (Abbas, 2005).

*A. flavus* es un hongo mesófilo que tiene un aspecto aterciopelado, algodonoso y de color verde. Su temperatura óptima de crecimiento es 37° C, es capaz de crecer en un rango de pH de 3.0 a 6.8 y su actividad de agua mínima para su desarrollo varía de 0.8 a 0.9 (Abarca, 2000). Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, estos hongos crecen en ciertos alimentos, dando como resultado la producción de micotoxinas, conocidas como aflatoxinas, que son

compuestos potencialmente cancerígenos. La contaminación más común de estos hongos se ha encontrado en nueces, cacahuates y otras semillas oleaginosas, incluyendo maíz y algodón. *A. flavus* es un hongo común en el almacén, sin embargo se ha encontrado que la infección y la formación de aflatoxinas pueden producirse desde el campo en varios cultivos (Christensen *et al.*, 1976).

#### 4.3.3.1. Características morfológicas de *A. flavus* y *A. parasiticus*

Los criterios seguidos hasta el momento para clasificar las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos son principalmente morfológicos. No obstante, en algunas secciones se han realizado además estudios bioquímicos o moleculares encaminados a resolver algunos de los problemas planteados en su clasificación. El sistema de identificación propuesto por Klich (2002), utiliza tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación. Cada cepa debe sembrarse en tres puntos equidistantes en dos placas de medio de cultivo CYA (Czapek, extracto de levadura y agar), una placa de CYA con 20% de sacarosa (CY20S), y una placa de MEA (extracto de malta agar). Una de las placas de CYA se incuba a 37°C y las restantes a 25°C.

Tras siete días de incubación se procede a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos (Figura 4).

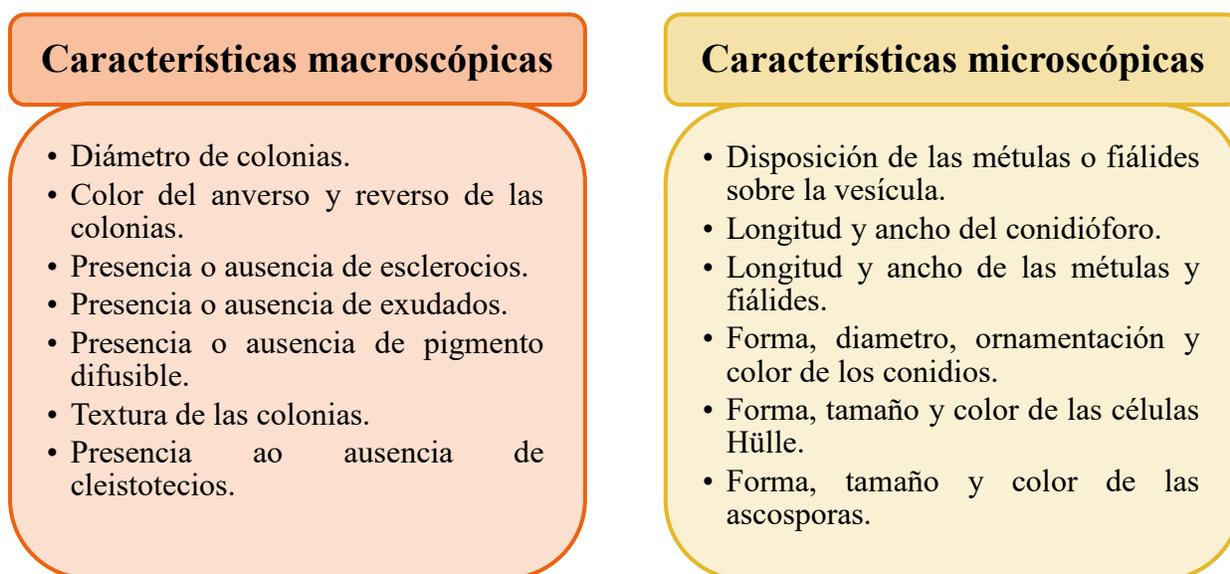


Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus*.

Fuente: Klich, 2002. (Elaboración propia, 2016).

Las características distintivas de *A. flavus* y *A. parasiticus* tanto macroscópicas como microscópicas se mencionan a continuación:

➔ **Características macroscópicas:** Colonias de *A. flavus* en CYA son de color verde oliváceo a verde amarillento (Figura 5) y la especie *A. parasiticus* presenta un tono verde oscuro a pardo; micelio blanco; esclerocios, cuando están presentes, de color marrón oscuro a negro, variables en forma y tamaño; el reverso de la colonia es incoloro, marrón claro o anaranjado; el aspecto de la colonia es variable, generalmente lanosa o flocosa. Las colonias en MEA de color oliváceo y ocasionalmente verde oscuras; micelio blanco, apenas visible; esclerocios a veces presentes de color marrón a negro, variables en tamaño y forma; reverso generalmente incoloro y a veces amarillo pálido. Colonia flocosa, especialmente en la zona central.



Figura 5. Colonia de *A. flavus*.  
Fuente: Instituto de Microbiología Clínica UACH, 2011.

➔ **Características microscópicas:** En *A. flavus* las cabezas conidiales pueden ser uniseriadas y biseriadas, para *A. parasiticus* son predominantemente uniseriadas y radiales (Figura 6); estipes normalmente rugosos, hialinos o de color marrón pálido. Vesícula esférica; métulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Forman conidios globosos o elipsoidales, lisos o ligeramente rugosos (Arrúa *et al.*, 2012).

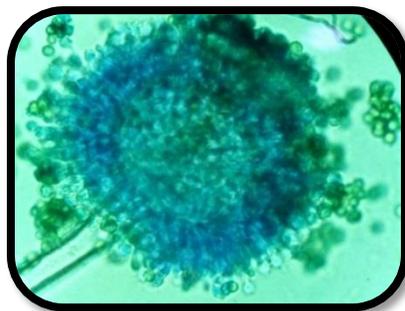
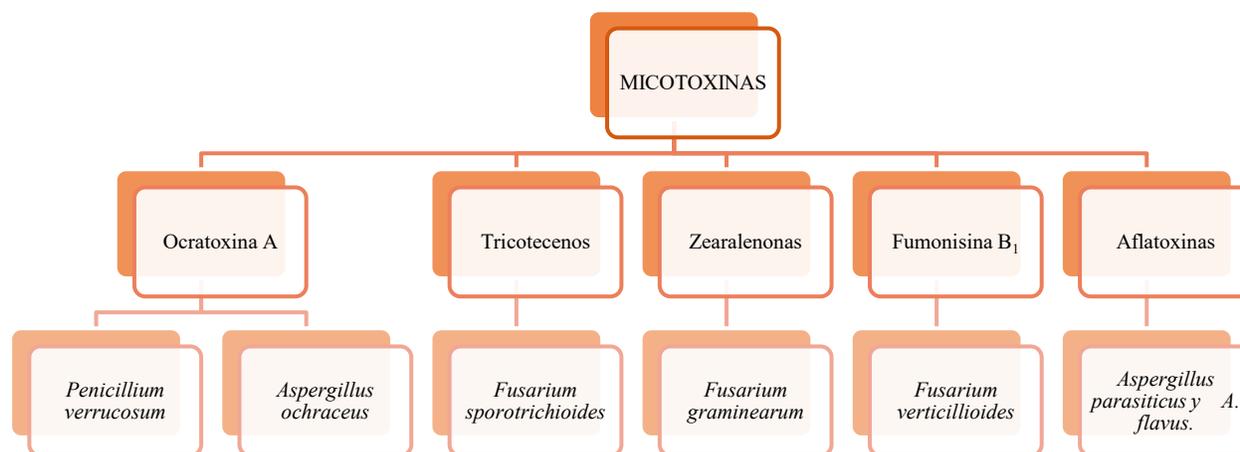


Figura 5. Conidióforo de *Aspergillus flavus*.  
Fuente: Elaboración propia, 2016.

#### 4.4. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos cuando invaden los granos y alimentos; ocasionan diversas patologías en animales y humanos llamadas micotoxicosis. Se han identificado entre 200 y 300 micotoxinas. Estos compuestos representan una amenaza potencial para la salud humana y animal a través de la ingesta de alimentos preparados a partir de productos contaminados. Las micotoxinas producen una amplia gama de efectos adversos y tóxicos en animales, ya que algunas de ellas son cancerígenas y producen hepatitis aguda, además de disminuir el sistema inmune. Los alimentos contaminados causan grandes pérdidas pecuarias. Los principales factores que inciden en su producción son la humedad (superior al 13%); la temperatura y los daños mecánicos, en el caso de los granos. Entre los principales géneros de hongos productores de micotoxinas se encuentran *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las micotoxinas más comunes que podemos encontrar en los alimentos y granos de uso pecuario son las aflatoxinas (AFLA), ocratoxina A (OTA), las fumonisinas (FUM), toxina T-2 o tricotecenos (T2) y la zearalenona (ZEA) (Figura 7) (Bennett, 2003).

Las micotoxinas son un grupo químicamente muy variado. Estas se pueden producir en diferentes etapas o procesos del manejo de los granos y alimentos, durante el tiempo que transcurre la cosecha, el secado y el almacenamiento (Abarca, 2000).

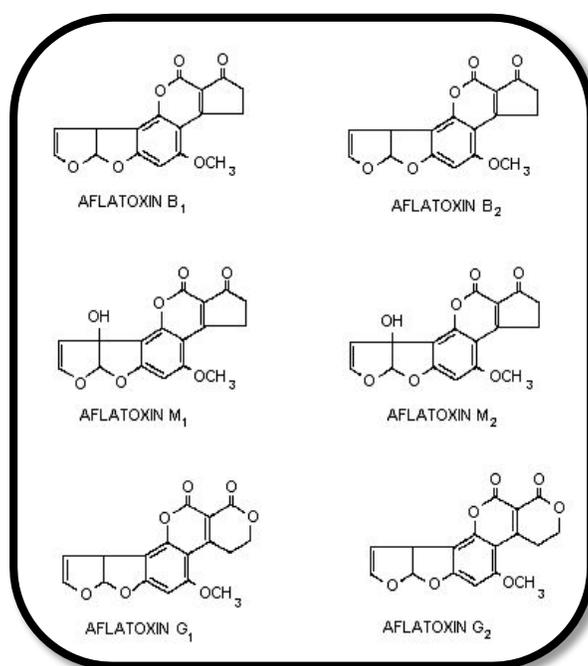


**Figura 7. Micotoxinas comunes en alimentos y granos.**

**Fuente: Abarca, 2000.**

## 4.5. Aflatoxinas

La palabra aflatoxina proviene de la primera letra “A” que denota al género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “FLA” correspondiente a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno. Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos principalmente por los hongos *A. parasiticus* Speare y *A. flavus* Link. Estos compuestos son carcinógenos producidos naturalmente y pueden contaminar alimentos para el ganado y consumo humano, por lo que son una amenaza potencial para la salud. La contaminación por aflatoxinas ha sido reportada prácticamente en todo el mundo. Las seis aflatoxinas principales son la B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, y la M<sub>2</sub> (Figura 8), la que se observa habitualmente en mayores concentraciones es la B<sub>1</sub>. Es considerada el compuesto biológicamente más activo de la familia de las aflatoxinas y se presenta en un número importante en alimentos para animales así como también en maíz, algodón y cacahuate (FAO, 1996).



**Figura 8. Estructura química de las principales aflatoxinas.**  
Fuente: FAO; Alimentación y Nutrición, 1996.

#### 4.6. Legislación de las aflatoxinas

En algunos países existe normatividad para los niveles de contaminación con aflatoxinas en ciertos alimentos que consumidos por humanos o animales, debido a su toxicidad. Las normas y límites máximos establecidos en cada país se mencionan a continuación:

- ➔ *NOM (Norma Oficial Mexicana)-188-SSA1-2002, Productos y servicios. Control de Aflatoxinas (AF) en cereales para consumo humano y animal.* Establece que el límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal no deben exceder de 20 µg/kg de AF totales, en el caso de observarse concentraciones desde 21 y hasta 300 µg/kg, el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal. De ser así y que la concentración sea mayor de 20 µg/kg de AF y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la tabla 4:

**Tabla 4. Límites de aflatoxinas permitidos en alimentos para animales.**

Especie/Etapa de producción	Límite máximo µg/kg
Aves (excepto pollos de engorda)	100
<b>Cerdos en engorda:</b>	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
<b>Rumiantes:</b>	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

Fuente: NOM-188-SSA1-2002.

Tabla 5. Límites permitidos por la FDA de los E. U. para aflatoxinas en alimentos.

<i>Producto</i>	Niveles comunes ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Niveles con episodios tóxicos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Niveles permisibles por la FDA
<i>Maní o cacahuete</i>	2-6	30-125	20 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en alimentos; 0,5 ppb aflatoxinas $M_1$ en leche.
<i>Mantequilla de maní</i>	10	14-213	
<i>Maní azucarado</i>	20	30-230	
<i>Maíz</i>	>10		

Fuente: <http://www.fda.gov/>. Elaboración propia, 2016.

Tabla 6. Reglamento técnico MERCOSUR sobre los límites máximos de aflatoxinas.

<i>Alimento</i>	<i>Aflatoxina</i>	<i>Límite</i>
1. Leche 1.1. Leche fluida 1.2. Leche en polvo	$M_1$ $M_1$	0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
2. Maíz 2.1. Maíz en grano $B_1+B_2+G_1+G_2$ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Entero, partido, aplastado, mondado). 2.2. Harinas o sémolas de maíz.	$B_1+B_2+G_1+G_2$	20 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
3. Maní o cacahuete 3.1. Maní $B_1+B_2+G_1+G_2$ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (sin descascarar, descascarado, crudo o tostado) 3.2. Maní en pasta (pasta de maní o manteca de maní).	$B_1+B_2+G_1+G_2$	20 ,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Fuente: Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz .MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02. Elaboración propia, 2016.

Tabla 7. Límites máximos admitidos de aflatoxinas por la Unión Europea.

<i>Producto</i>	<i>Límite máximo</i>
<i>Cacahuates, frutos con cáscara y frutos secos para consumo humano</i>	2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
<i>Cacahuates procesados</i>	8 $\mu\text{g}/\text{kg}$
<i>Cereales derivados</i>	2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
<i>Maíz procesado</i>	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
<i>Espicias</i>	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Fuente: Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 2174/2003. Elaboración propia, 2016.

#### 4.7. Métodos de análisis de micotoxinas.

Los efectos nocivos o dañinos de las micotoxinas, resultan en grandes pérdidas económicas en las producciones agrícolas y existe además un alto riesgo para la salud humana cuando se consumen productos por ellas contaminadas. Los métodos cuantitativos oficiales de análisis de micotoxinas aprobados por AOAC, se apoyan en principios fisicoquímicos. Dichos métodos tienen poca especificidad o requieren procesos de limpieza largos y costosos.

Para determinar si los productos están contaminados con micotoxinas, se deben analizar cada uno de ellos. Los procedimientos apropiados de muestreo son un pre-requisito para obtener resultados que sean confiables debido a la distribución heterogénea de las micotoxinas en los granos y otros productos destinados a la alimentación humana y animal (A.O.A.C, 1995).

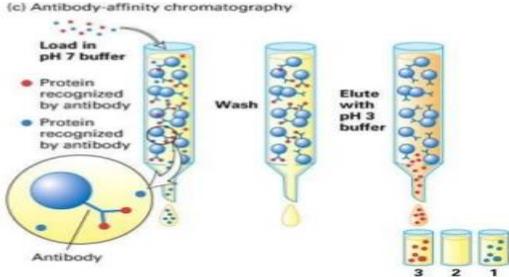
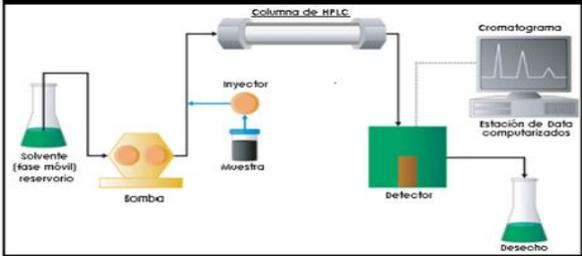
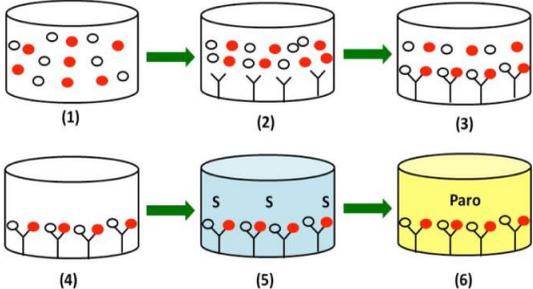
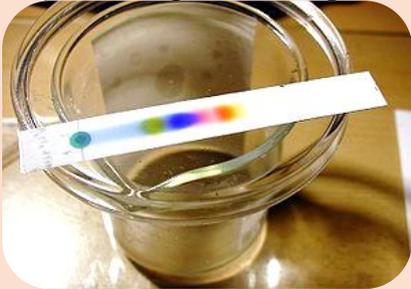
Desde 1975, se sentaron bases para la aplicación de los métodos inmunoquímicos a la determinación de micotoxinas puesto que aislaron anticuerpos para el reconocimiento de aflatoxina  $B_1$  (Chu y Ueno, 1977). Los métodos inmunoquímicos se fundamentan en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Un anticuerpo (Ac) es una sustancia proteica producida en un animal como respuesta a la aplicación de un inmunógeno (antígeno Ag), sustancia que es considerada extraña por el organismo animal y frente a la cual se genera una reacción de defensa.

Por su origen los anticuerpos son muy específicos en cuanto al reconocimiento del antígeno, permite por ello la determinación de cantidades muy pequeñas, en forma selectiva de dicho antígeno.

**Análisis de Inmunofinidad.-** es una cromatografía de afinidad o sea una técnica de separación de solutos que aprovecha la correspondencia biológica de atracción entre un anticuerpo que se tiene anclado a una fase sólida (empacada en una columna) y la molécula que se va a separar (antígeno) (A.O.A.C, 1995).

Los métodos convencionales de análisis para las micotoxinas se mencionan en la Tabla 7, se describe en que consiste cada método y se encuentran ordenados en relación a los más utilizados en la actualidad:

Tabla 7. Métodos de detección de micotoxinas.

<p>→ <b>Columnas de inmunoafinidad.</b></p>  <p>(c) Antibody-affinity chromatography</p> <p>Load in pH 7 buffer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Protein recognized by antibody</li> <li>● Protein recognized by antibody</li> </ul> <p>Antibody</p> <p>Wash</p> <p>Elute with pH 3 buffer</p> <p>3 2 1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Este método consiste en el empleo de columnas que están constituidas con anticuerpos monoclonales que son específicos para la estructura de la aflatoxina, cuando esta pasa a través de la zona de anticuerpos específicos.</li> </ul>
<p>→ <b>HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución).</b></p>  <p>Solvente (fase móvil) reservorio</p> <p>Bomba</p> <p>Inyector</p> <p>Muestra</p> <p>Columna de HPLC</p> <p>Detector</p> <p>Estación de Datos computarizados</p> <p>Desecho</p> <p>Cromatograma</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se utiliza una columna de fase inversa, seguida de la separación de la reacción para proveer a la aflatoxina de la fluorescencia necesaria para poder cuantificarse.</li> </ul>
<p>→ <b>ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas).</b></p> <p>○ Micotoxina-enzima-conjugado      ● Micotoxina</p> <p>Y Anticuerpo anti-micotoxina      S Substrato</p>  <p>(1) (2) (3)</p> <p>(4) (5) (6)</p> <p>Paro</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se basa en la capacidad de un anticuerpo específico para distinguir la estructura tridimensional de una micotoxina determinada. Consiste en la reacción en equilibrio del complejo antígeno-anticuerpo.</li> </ul>
<p>→ <b>TLC (Cromatografía de capa fina).</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es un método de multidetección por el que pueden determinarse la mayoría de las micotoxinas. Para detectar las micotoxinas se usa como revelador la lámpara de luz U. V. de longitud larga, floreciendo color azul y verde.</li> </ul>

Fuente: Elaboración propia, 2016.

## 4.8. Prácticas para la prevención y reducción de la contaminación de cacahuate por aflatoxinas

### 4.8.1. Buenas prácticas agrícolas (BPA)

Las buenas prácticas agrícolas, son aquellas que se realizan con la finalidad de disminuir o evitar daños ambientales, para mantener una buena producción y obtener productos inocuos para las personas que consuman el cacahuate. Es por eso que en la Tabla 9 se mencionan recomendaciones en cada proceso de recolección y almacenamiento, para obtener un producto libre de aflatoxinas (FAO/OMS, 1996).

**Tabla 9. Buenas prácticas agrícolas (BPA) para cacahuate.**

<b>❖ Prácticas recomendadas basadas en las buenas prácticas agrícolas (BPA)<sup>1</sup></b>	
<b>Antes de la recolección<sup>2</sup></b>	1.- Se deben tomar en cuenta diversos factores medioambientales y agronómicos que influyen en la infección de las vainas y las semillas por los hongos productores de aflatoxinas así como en la producción de estas toxinas. Por ejemplo sequía y altas temperaturas.
	2.- Realizar análisis del suelo para determinar si es necesario aplicar fertilizantes y/o acondicionadores del suelo con objeto de garantizar un pH adecuado y el aporte de nutrientes a las plantas para evitar condiciones adversas, especialmente durante el desarrollo de las semillas, cuando aumenta la vulnerabilidad del cacahuate a la infestación fúngica.
	3.- Se debe seleccionar un cultivar adecuado para un determinado período de crecimiento y que madure al final de la estación de las lluvias, de manera que el secado en el campo después de la recolección pueda realizarse en condiciones favorables. No es conveniente seleccionar una variedad que se pueda ver afectada por el déficit hídrico durante la maduración de la vaina, y puede ser necesario alcanzar un compromiso entre la recolección en condiciones de escasa humedad y la manera de evitar el déficit hídrico mediante la utilización de cultivares de ciclo corto que maduran antes del final de las lluvias.
	4.- El riego, destinado a asegurar una adecuada humedad del suelo durante las últimas cuatro a seis semanas de crecimiento del cultivo, debería reducir al mínimo la contaminación por aflatoxinas del cacahuate antes de la recolección. Esto se puede conseguir mediante

<sup>1</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

	<p>un cultivo totalmente de regadío o con la aplicación de riego complementario a cultivos básicamente de secano. Si se utiliza el riego, es necesario cerciorarse de que se aplica de manera uniforme y de que todas las plantas de la parcela reciben un suministro de agua adecuado.</p>
	<p>5.- Las prácticas de labranza y de protección de los cultivos que reducen la presencia en el suelo de insectos, acáridos y nematodos deberían ayudar a reducir la contaminación por aflatoxinas. Se han de reducir al mínimo los daños provocados por insectos y por infecciones fúngicas en las proximidades del cultivo, mediante el uso adecuado de insecticidas y fungicidas registrados y otras prácticas apropiadas comprendidas en un programa de lucha integrada contra las plagas. Los productores deben consultar a las autoridades locales o nacionales para determinar qué insectos y otras plagas habituales en su región pueden infestar el maní haciéndolo más vulnerable a las infecciones fúngicas que pueden producir aflatoxinas.</p>
	<p>6.- No parece que se haya adoptado ningún fungicida o combinación de fungicidas u otro tratamiento químico para combatir en la práctica la infección por <i>Aspergillus flavus</i> o <i>A. parasiticus</i> y la posterior contaminación por aflatoxinas del cacahuete antes de la recolección.</p>
<p><b>Recolección<sup>3</sup></b></p>	<p>1.- Las asociaciones de comercio, así como las autoridades locales y nacionales, deben tomar la iniciativa con vistas a difundir información a los productores sobre los peligros asociados con la contaminación por aflatoxinas del cacahuete y sobre cómo pueden poner en práctica procedimientos de recolección seguros para reducir el riesgo de contaminación por hongos, microbios y plagas.</p>
	<p>2.- Es necesario asegurarse de que todo el equipo que se vaya a utilizar para la recolección y para el almacenamiento de la cosecha están en buen estado. Una avería en este período crítico puede ocasionar pérdidas de calidad del cacahuete y fomentar la formación de aflatoxinas.</p>
	<p>3.- Es muy importante recolectar el cultivo cuando ha alcanzado su madurez óptima, ya que la presencia durante la recolección de un número excesivo de vainas demasiado maduras o muy verdes puede dar lugar a niveles altos de aflatoxinas en el producto; además, un retraso de la recolección del cacahuete ya infectado puede ocasionar un aumento significativo del contenido de aflatoxinas de la cosecha.</p>
	<p>4.- Las plantas que mueren debido a la infestación por plagas, patógenos como <i>Sclerotium rolfsii</i> o <i>Fusarium</i> spp. y enfermedades como el virus de la roseta del cacahuete, o insectos como la termita, la forficula o el falso estróngilo capaces de causar daños a las vainas, deben recolectarse de forma independiente, ya que sus frutos probablemente contienen aflatoxinas.</p>

<sup>3</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

	<p>5.- Si el cacahuate se ha regado, debe velarse porque las plantas que están fuera del alcance de los sistemas de riego se recolecten por separado, para evitar mezclar el cacahuate exento de aflatoxinas con el que puede estar, potencialmente, contaminado.</p> <p>6.- Hay que evitar, en la medida de lo posible, dañar las vainas durante la recolección, ya que esto puede favorecer una rápida contaminación de las vainas por <i>A. flavus</i> o <i>A. parasiticus</i>.</p> <p>7.- Tras la recolección, las vainas deben quedar expuestas para que el secado sea lo más rápido posible. Para ello, se puede dar la vuelta a las matas de manera que las vainas queden en la parte superior, alejada del terreno y expuesta al sol y al viento. El curado se debe completar hasta una actividad acuosa segura lo antes posible para impedir la proliferación de microorganismos, particularmente de los hongos que producen aflatoxinas.</p> <p>8.- El secado del cacahuate debe realizarse de manera que se reduzcan al mínimo los daños y el contenido de humedad se mantenga por debajo del necesario para el desarrollo de mohos durante el almacenamiento (por lo general, menos del 10% de humedad), con objeto de impedir la proliferación adicional de diversas especies de hongos en el cacahuate.</p>
<b>Transporte<sup>4</sup></b>	<p>1.- El cacahuate debe trasladarse a un almacén adecuado o a la zona de procesamiento para su elaboración inmediata lo antes posible después de la recolección o el secado.</p> <p>2.- Los contenedores (por ejemplo, vagones, camiones) que vayan a utilizarse para recoger el cacahuate recolectado y transportarlo a las instalaciones de secado, o a los almacenes tras el secado, deben estar limpios, secos y exentos de insectos y de proliferación visible de hongos antes de su utilización o reutilización.</p> <p>3.- Las remesas de cacahuate deben protegerse de toda acumulación de humedad adicional mediante el uso de contenedores cubiertos o herméticos, o lonas alquitranadas. Deben evitarse las fluctuaciones térmicas que puedan ocasionar condensación en el cacahuate, ya que esto podría dar lugar a una acumulación local de humedad y al consiguiente desarrollo de hongos con formación de aflatoxinas.</p> <p>4.- Debe analizarse la contaminación por aflatoxinas de las existencias de cacahuate del agricultor con objeto de realizar una separación más precisa para su almacenamiento correcto. Las cargas exentas de aflatoxinas se deben separar de las cargas con un nivel bajo de contaminación por aflatoxinas, destinadas a una elaboración y limpieza adicionales, y de las cargas con un nivel alto de contaminación.</p>

<sup>4</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

<p style="text-align: center;"><b>Separación de lotes contaminados por aflatoxinas<sup>5</sup></b></p>	<p>1.- Se ha investigado de forma exhaustiva la distribución de las aflatoxinas en el cacahuete. Los resultados de las investigaciones indican que la selección en función de la calidad permite eliminar una gran parte de las aflatoxinas presentes en el momento de la recolección. La distribución de las aflatoxinas en un lote de cacahuete es muy heterogénea y, por consiguiente, el plan de muestreo utilizado es fundamental.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Almacenamiento</b></p>	<p>1.- El almacenamiento del cacahuete después de la recolección es la fase en la que más puede agravarse el problema de las aflatoxinas en este producto. Para evitar la contaminación por aflatoxinas en el almacenamiento, el principal objetivo es impedir la proliferación de hongos en el cacahuete debida a la condensación de humedad o a goteras en el almacén.</p> <p>2.- Para impedir que el cacahuete vuelva a mojarse tras el secado, es necesario un almacén correctamente ventilado, con una cubierta adecuada, preferiblemente con doble muro lateral, y con suelo de hormigón. Pintar de blanco las cubiertas de los almacenes reduce la carga de calor del sol con respecto a la que reciben los materiales galvanizados tradicionales.</p> <p>3.- La distribución uniforme de la carga en el almacén permite la salida del exceso de calor y humedad y reduce las zonas favorables para la infestación por insectos. El apilamiento de existencias de cacahuete puede producir la acumulación de calor y humedad, que da lugar a la proliferación de hongos y la contaminación por aflatoxinas.</p> <p>4.- Para impedir que aumente la concentración de aflatoxinas durante el almacenamiento y el transporte, es necesario mantener un bajo contenido de humedad, una temperatura ambiental adecuada y condiciones higiénicas. Los hongos <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> no pueden desarrollarse ni producir aflatoxinas con actividades acuosas inferiores a 0,7; la humedad relativa debe mantenerse por debajo del 70%, y las temperaturas entre 0 y 10°C son óptimas para reducir al mínimo el deterioro y el crecimiento de hongos durante el almacenamiento a largo plazo.</p> <p>5.- Se debe vigilar, mediante programas de muestreo y análisis adecuados, el contenido de aflatoxinas del cacahuete que se introduce o se retira del almacén.</p> <p>6.- Debe medirse la temperatura del cacahuete de forma periódica durante su almacenamiento. Un incremento de la temperatura puede indicar proliferación microbiana y/o infestación por insectos. Debe</p>

<sup>5</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

	<p>inspeccionarse el cacahuete visualmente para comprobar si existe proliferación de hongos; deben separarse las partes del producto que parezcan infectadas y enviarse, si es posible, muestras para su análisis; tras la separación, debe reducirse la temperatura del producto restante y ventilarlo. No debe utilizarse cacahuete infectado para producir alimentos o piensos.</p>
	<p>7.- Deben documentarse los procedimientos de recolección y almacenamiento utilizados en cada temporada, tomando nota de las mediciones (por ejemplo, la temperatura y la humedad) y de cualquier desviación o cambio con respecto a las prácticas tradicionales. Esta información puede ser muy útil para explicar las causas de la proliferación de hongos y la formación de aflatoxinas en una campaña agrícola concreta, y puede ayudar a evitar que se cometan errores similares en el futuro.</p>

#### 4.8.2. Buenas prácticas de fabricación (BPF)

Las buenas prácticas de fabricación, es un prerrequisito para el almacenamiento del producto ya que se debe evitar que no haya una fuente de contaminación. Por lo que se tienen un conjunto de medidas para asegurarse que el personal que este en contacto con el producto no tenga posibilidad de contaminarlo (Tabla 10).

**Tabla 10. Buenas prácticas de fabricación (BPF) para cacahuete.**

❖ Buenas prácticas de fabricación (BPF)	
<p><b>Recepción y descascarado<sup>6</sup></b></p>	<p>1.- Las existencias de cacahuete del agricultor que se reciben en la planta de descascarado deben inspeccionarse a su llegada. Es aconsejable conocer el origen e historial de cada lote de cacahuete. Hay que examinar el vehículo de transporte; si no es completamente cerrado, debe disponer de una cubierta, como una lona alquitranada, para proteger el producto de la lluvia o de otras fuentes de humedad. Durante la descarga, debe observarse el aspecto general del cacahuete. Si se puede percibir la humedad del cacahuete al tacto, NO debe mezclarse con el cacahuete almacenado sin envasar. El vehículo que contiene el cacahuete debe quedar aparcado a la espera de que se tome una decisión sobre la evacuación del producto. Si es posible, debe tomarse una muestra de cada lote, deben separarse los granos y debe descascararse el resto para observar la calidad del cacahuete antes de tomar una decisión relativa a la aceptación del producto.</p> <p>2.- Las especificaciones relativas a la compra de cacahuete destinado a elaboración posterior adicional deben incluir un nivel máximo de aflatoxinas basado en métodos de análisis adecuados y en un plan de muestreo correcto.</p>

<sup>6</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

	<p>3.- Deben tomarse precauciones especiales para rechazar el cacahuete que presente signos de daños por insectos o proliferación de hongos, debido al peligro de que contengan aflatoxinas. Deben conocerse los resultados de los análisis de aflatoxinas del cacahuete empleado como materia prima antes de permitir su elaboración. Cualquier lote de cacahuete con un nivel inaceptable de aflatoxinas, que no pueda reducirse a niveles permitidos mediante los equipos de selección disponibles, debe rechazarse.</p> <p>4.- La industria de elaboración de cacahuete debe asegurarse de que el proveedor de cacahuete descascarado sea capaz de controlar adecuadamente sus propias operaciones para garantizar que el producto acabado no sobrepase el límite máximo de aflatoxinas.</p> <p>5.- Debe examinarse la posible presencia de hongos en todos los granos con cáscara suelta, dañados y de tamaño inferior al normal. Si no hay hongo externo visible, los granos deben partirse para descubrir la posible proliferación oculta de hongo. La proliferación excesiva de hongo o la presencia de uno que se asemeje a <i>A. flavus</i> es motivo para realizar un análisis químico de la presencia de aflatoxinas o para rechazar el lote.</p>
<p><b>Selección<sup>7</sup></b></p>	<p>1.- La selección es la etapa final para eliminar los granos defectuosos. Las cintas de selección deben estar bien iluminadas; no deben transportar más de una capa de cacahuete y su velocidad debe ser tal que permita garantizar que los trabajadores que realizan la selección a mano eliminen eficazmente la materia extraña y los granos defectuosos. La maquinaria de selección debe ajustarse, con patrones de referencia, con la mayor frecuencia posible, para asegurar que se retiren todos los granos defectuosos.</p> <p>2.- Para eliminar de forma eficaz los granos contaminados por hongo, se debe realizar una selección antes y después del escaldado y tostado. Si la elaboración incluye el partido, los granos que no se abren deben eliminarse. Se ha de comprobar la eficacia de las técnicas de selección, mediante análisis periódicos del contenido de aflatoxinas de la corriente de cacahuete seleccionado o del producto acabado, o de ambos. Dichos análisis deben realizarse con la frecuencia suficiente para asegurarse de que el producto sea plenamente aceptable.</p> <p>3.- Los granos defectuosos (enmohecidos, con alteraciones del color, rancios, marchitos, arrugados, dañados por insectos o que presenten otros daños) deben ensacarse por separado y deben etiquetarse como no aptos para el consumo humano. Los contenedores de cacahuete defectuoso deben retirarse de la zona de elaboración lo antes posible. Los materiales contaminados o que presenten peligro de contaminación por aflatoxinas deben desviarse a usos no alimentarios.</p>

<sup>7</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

	<p>4.- El cacahuete rechazado en el proceso de selección se debe destruir o separar de los productos comestibles. Si se va a destinar a la trituración, se debe ensacar por separado y se debe etiquetar como no apto para el consumo humano directo en su estado actual.</p>
	<p>5.- El escaldado, utilizado junto con mesas de gravedad y con la selección manual o electrónica, permite eliminar de forma muy eficiente las aflatoxinas de los granos contaminados. Se ha comprobado que la selección por color, combinada con el escaldado, puede reducir la contaminación por aflatoxinas hasta en un 90%.</p>
<p><b>Envasado y almacenamiento de producto final<sup>8</sup></b></p>	<p>1.- Los cacahuates deben envasarse en sacos de yute claros, cajas de cartón o sacos de polipropileno. Si se utilizan sacos de yute, debe velarse por que los sacos no se hayan tratado con aceites minerales a base de hidrocarburos. Todos los sacos o cajas deben llevar indicado el lote del producto, para facilitar su rastreabilidad antes de su traslado a instalaciones de almacenamiento controlado o su transporte.</p>
	<p>2.- El cacahuete elaborado debe almacenarse y transportarse en condiciones que permitan mantener la integridad del contenedor y de su contenido. Los medios de transporte deben estar limpios, secos, protegidos de la intemperie, exentos de infestación y sellados para impedir que el agua, los roedores o los insectos alcancen el producto. El cacahuete se debe cargar, mantener y descargar protegido de daños y de la humedad. Se recomienda el transporte en vehículos bien aislados o refrigerados cuando las condiciones climáticas lo hagan necesario. Cuando se descarga cacahuete de un vehículo refrigerado, o tras el almacenamiento en frío, deben extremarse las precauciones para impedir la condensación. En condiciones climáticas calurosas y húmedas, hay que dejar que los cacahuates alcancen la temperatura ambiente antes de exponerlos a las condiciones externas; este acondicionamiento puede requerir uno o dos días. El cacahuete que haya caído al suelo es vulnerable a la contaminación y no debe utilizarse para productos comestibles.</p>

<sup>8</sup> FAO/OMS, 1996. Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos.

## 4.9. Técnicas del manejo integrado de plagas y enfermedades

El llamado manejo integrado de plagas es un conjunto de técnicas de control que son eficaces desde el punto de vista biológico (por ejemplo inhibitorio, antibiótico), ecológico y económico; posibilita y resalta el empleo de elementos naturales para regular poblaciones de plagas o patógenos por debajo del nivel de daño que sería económicamente aceptable. Una de las herramientas del manejo integrado de plagas es el control biológico, que aunque data de los principios de la agricultura, se formalizó como disciplina a principios del siglo XX y que ha adquirido nuevamente relevancia por la preocupación de la preservación del ambiente y la inocuidad alimentaria (Serrano y Galindo, 2007). El control biológico forma parte de diversas técnicas de control en los cultivos (Figura 9).

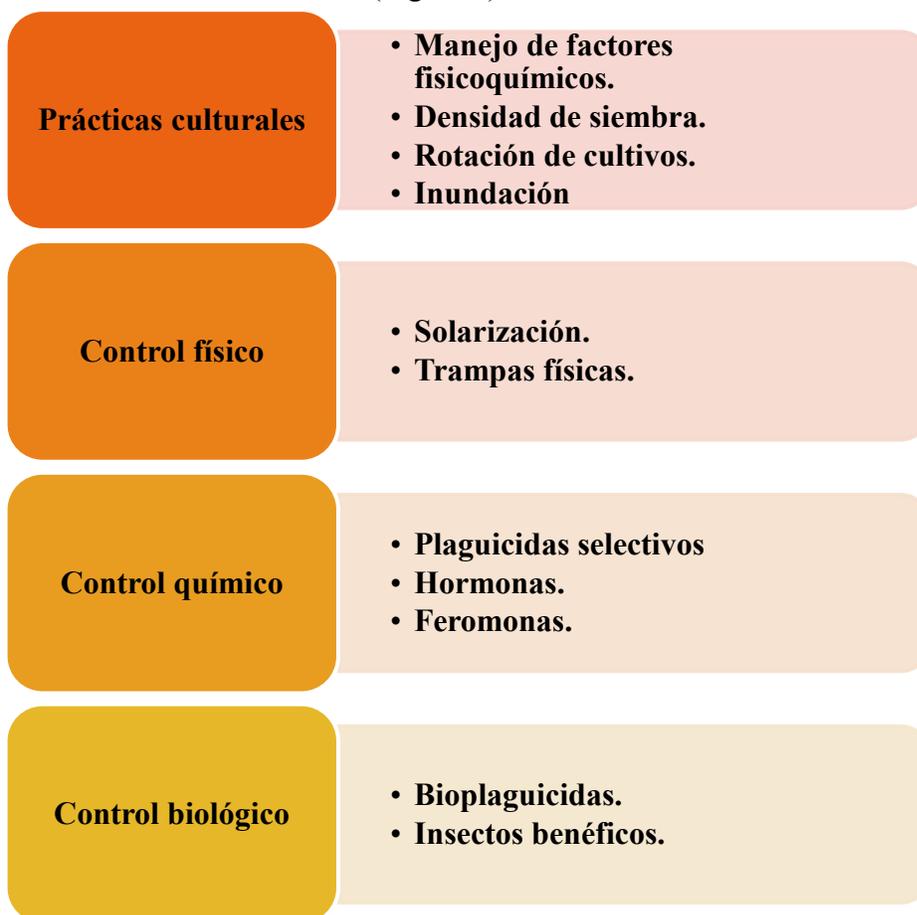


Figura 9. Técnicas de manejo integrado de plagas y enfermedades.  
Fuente: Serrano y Galindo, 2007.

#### 4.10. Importancia del control biológico

La primera vez que el término de control biológico se utilizó fue por Harry S. Smith en 1919, en California, E. U. A., para referirse al uso de enemigos naturales para el control de insectos plaga (Jacas, 2010).

Su alcance se ha extendido con el tiempo, a tal grado que ahora se presentan problemas para definirlo adecuadamente, en particular porque el término implica aspectos académicos y aplicados (Nigam, 1988). Greathead y Waage (1983) definen el control biológico como “uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas”. Otro concepto es el de Eilenberg *et al.* (2001) en donde señala que el término “organismos vivos” también incluye a los virus, pero excluye los genes o fragmentos de genes, así como los metabolitos obtenidos en la ausencia de los organismos que los producen. Por lo cual, el control biológico de plagas se realiza mediante parasitoides, depredadores y patógenos, pero no a través de cultivos transgénicos. En el caso de control biológico de maleza se incluye el uso de organismos fitófagos y patógenos. A los agentes de control biológico de fitopatógenos, causantes de enfermedades, se les conoce comúnmente como antagonistas (Zavaleta *et al.*, 2015).

A nivel mundial se está dando a conocer que la disciplina del control biológico como estrategia de combate de plagas inició a fines del siglo XIX. En 1889 se reportó el primer caso exitoso de control biológico, realizándose en la escama algodonosa de los cítricos, *Icerya purchasi* Maskell, en California, E .U. A.: después de introducir desde Australia a la Catarina depredadora “Vedalia” (Figura 10), *Rodolia cardinalis* (Zavaleta *et al.*, 2015).



Figura 10. Catarina depredadora “Vedalia” *Rodolia cardinalis* (Mulsant).  
Fuente: Zavaleta, 2015.

Aunque el control biológico presenta múltiples ventajas económicas y ecológicas, esta no es una solución, ya que no se habla de una eliminación total de plagas y enfermedades, por lo que también posee sus desventajas. Históricamente se dio por hecho que la introducción de agentes exóticos de control biológico era ambientalmente segura y sin riesgos, esto no siempre es cierto. Ya que en ocasiones llega a dañar también especies hacia las cuales no iba dirigido el control, llegando a atacar organismos benéficos, esta es una de las principales problemáticas de las invasiones biológicas (Zavaleta, 2015). Pero si se realiza una adecuada planificación de la aplicación del control biológico y una evaluación de los enemigos naturales no habría porque cometer errores.

#### 4.10.1. Control biológico de hongos fitopatógenos

El control biológico es una de los métodos de combate en el control de plagas y enfermedades, por sus innegables ventajas ambientales, y consiste en el uso de organismos vivos para disminuir la densidad de población o el impacto de un organismo, y hacerle menos abundante o menos perjudicial de lo que es (Pfenning, 2011).

Las enfermedades vegetales resultan de la interacción de un patógeno con un hospedero u hospedante susceptible en un ambiente favorable. En el siguiente triángulo de la enfermedad se ejemplifica cómo un cuarto factor actúa como control biológico; los organismos antagonistas (Figura 11).

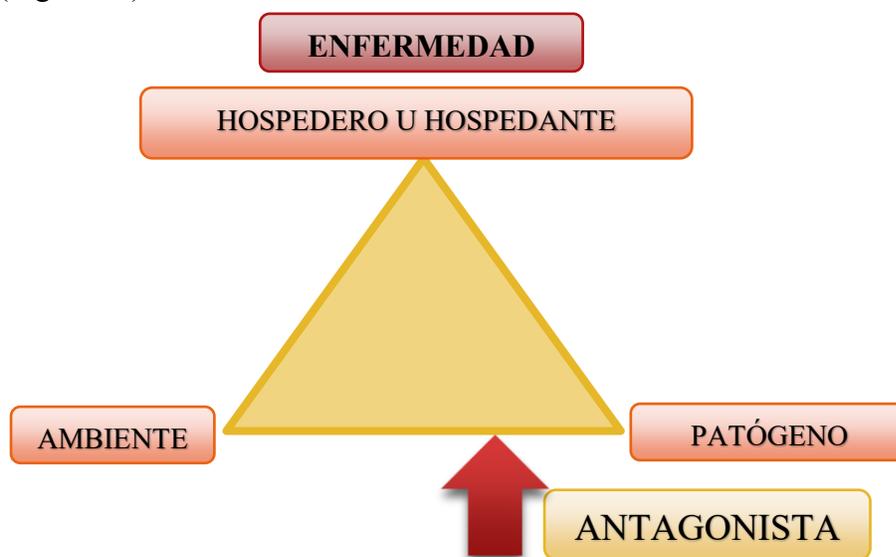


Figura 11. Concepto de control biológico de enfermedades vegetales.  
Fuente: Elaboración propia, 2016.

Definiendo entonces que el control biológico es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o un parásito, en estado activo o latencia, por la acción de uno o más organismos (Baker y Cook, 1974).

Los componentes de control biológico son cuatro: patógeno, antagonista, ambiente y huésped (Tabla 11):

**Tabla 11. Componentes del control biológico.**

<b>Patógenos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las enfermedades de las plantas pueden ser causadas por agentes bióticos como hongos, bacterias, virus, etc., o abióticos, que son capaces de alterar el normal funcionamiento de las plantas y resultar una enfermedad.</li> <li>• El control del patógeno se puede aplicar en cualquier parte de su ciclo de vida; existen diversas estrategias de control, basadas en la epidemiología, que pueden ir dirigidas a la eliminación o la reducción del inóculo inicial o bien a la disminución del desarrollo de la enfermedad. Estas estrategias serán eficientes dependiendo del tipo de patógeno al que nos enfrentemos, monocíclico o policíclico .</li> <li>• En el control de los patógenos vegetales se consideran también otros aspectos como su naturaleza, es decir, si son biótrofos o necrotrofo, su accesibilidad al antagonista, etc.</li> </ul>
<b>Antagonistas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El antagonismo es toda acción directa o indirecta ejercida por microorganismos que resulta en la reducción de la expresión de una enfermedad. En términos de control, los antagonistas son agentes biológicos con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. Los antagonistas pueden ser todo tipo de organismos: hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus y plantas. El término es equivalente al de enemigos naturales, utilizado en el caso de las plagas. Un microorganismo antagonista puede presentar cinco modos de acción frente a un patógeno:             <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- <b>Competencia:</b> es la lucha de dos o más organismos por conseguir un sustrato que no es suficiente para todos ellos (Baker y Cook, 1974). La competencia puede ser por nutrientes, factores de crecimiento y espacio.</li> <li>2.- <b>Antibiosis:</b> es la inhibición del crecimiento o de las actividades metabólicas de un organismo por la acción de una sustancia (a bajas concentraciones) producida por otro organismo.</li> <li>3.- <b>Explotación:</b> incluye la depredación y el parasitismo directo, implica un contacto íntimo entre el huésped y el parásito. En el control biológico el único parasitismo importante es el hiperparasitismo o interrelación que se presenta entre un hongo y otro que, a su vez, es parásito de las plantas superiores.</li> <li>4.- <b>Resistencia inducida:</b> es un fenómeno en el cual los mecanismos de defensa del huésped reconocen y responden a un organismo menos dañino, el agente de biocontrol, de modo que el huésped está listo para un ataque al patógeno.</li> <li>5.- <b>Lisis:</b> es la destrucción o desintegración enzimática total o parcial de un organismo. Las enzimas implicadas en el proceso son hidrolasas de los tipos, quitinasas y glucanasas.</li> </ol> </li> </ul>

<b>Huéspedes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La planta huésped es un participante en todos los sistemas de control biológico dirigidos a la supresión de las actividades inductoras de enfermedad de los patógenos, así como en muchos casos de control biológico dirigido a regular la cantidad de inóculo de éste. Puede actuar directamente suprimiendo la patogénesis o la reproducción del patógeno por mecanismos de resistencia o indirectamente al proporcionar el punto de acción de uno o más antagonistas.</li> </ul>
<b>Ambiente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incluye temperatura, potencial hídrico, radiación, pH, cargas superficiales, presión parcial de gases, iones y elementos y compuestos de carbono que contienen energía. Cada uno de estos factores varía en tiempo y en especie e interacciona entre ellos. El ambiente abiótico es dinámico, heterogéneo y complejo. Su medida y conocimiento son difíciles y sigue siendo un gran reto para el control biológico y en general para la fitopatología.</li> </ul>

En el control biológico de fitopatógenos se emplean principalmente dos estrategias (Zavaleta, 2015):

- 1) Tomando ventaja de los antagonistas residentes o nativos partiendo del hecho de que en la naturaleza existen infinidad de enemigos naturales de los patógenos.
- 2) Mediante la introducción de antagonistas.

En este sentido los microorganismos antagonistas comprenden aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos (Figura 12).



Figura 12. Desarrollo tecnológico para la comercialización de control biológico de fitopatógenos.

Fuente: Serrano y Galindo, 2007.

#### 4.11. Control biológico en México

El control biológico como disciplina y método de combate de plagas se inició en México prácticamente después de conocerse el éxito de la catarinita *Vedalia (Rodolia cardinalis)*, acontecido en Estados Unidos (Barrera, 2006).

Un ejemplo de aplicación del control biológico en nuestro país inicio en la década de 1940 con la introducción de *Aphelinus mali* (Haldeman) para el control del pulgón lanígero del manzano *Eriosoma lanigerum*, en Coahuila (Barrera, 2006).

Con la fundación de la Comisión de Parasitología Agrícola en 1900, se planearon programas enfocados al reconocimiento de hongos entomopatógenos para el control de chapulines y langosta; el desarrollo de metodologías para la cría masiva de *Pyemotes ventricosus* (Newport) y su suso en el control del picudo del algodónero *Anthonomus grandis* Boheman; la exploración de enemigos naturales de la mosca pinta *Aeneolamia postica* (Walker); y la importación desde Europa de *Salmonella typhi murinum* Loeffler para el control de rata de campo (Rodríguez *et al.*, 2015).

##### 1) Mediante la introducción de antagonistas

El control de patógenos mediante la introducción de antagonistas es la que más atención ha recibido; no obstante, es difícil que los antagonistas introducidos se establezcan en suelos no tratados (sin fumigación, debido a que se busca introducir un organismo extraño en una comunidad biológicamente diversa. La detección y selección de antagonistas con eficacia comprobada es apenas la primera etapa de muchas más que implican investigación en métodos de producción masiva, formulación apropiada que garantice la viabilidad y vida de anaquel del producto, métodos de aplicación y compatibilidad de agroquímicos utilizados y prácticas culturales realizadas en la producción de cultivos. En México el hongo *Trichoderma* spp., que es un micoparásito, y que además secreta antibióticos y enzimas degradadoras de pared celular, se ha reconocido como uno de los agentes de control biológico y antagonistas con gran potencial de desarrollo comercial para el manejo de enfermedades inducidas por fitopatógenos con origen en el suelo (Barrera, 2006).

El interés por el control biológico de enfermedades de las plantas a nivel mundial incrementó a partir de la década de 1960; actualmente podemos constatar que el desarrollo de alternativas de manejo de fitopatógenos ha sido relativamente lento. Quizás el mayor obstáculo en el avance de esta tecnología de control de enfermedades radicó en equipararla con el control químico, y en identificarla como una práctica de control que resolvería los problemas fitosanitarios de los cultivos agrícolas. Esta práctica debe considerarse como una estrategia de un programa de manejo integrado de enfermedades, en el que mediante la aplicación de varios métodos de control logre una disminución poblacional del fitopatógeno en los agroecosistemas, de tal forma que su impacto económico en los cultivos se reduzca de manera consistente (Zavaleta, 2015).

De los microorganismos que se han aprobado en México para el control biológico de fitopatógenos destacan los hongos. Aproximadamente alrededor del 63% corresponden a hongos y el 31% a bacterias. El potencial de levaduras y actinomicetos como agentes de control biológico ha sido menos explorado. La búsqueda de agentes de control biológico se ha centrado principalmente en dos géneros de microorganismos: *Trichoderma* y *Bacillus*, y de estos las especies *T. harzianum* Rifai y *B. subtilis* (Ehrenberg). Otros hongos y bacterias que han utilizado con menor frecuencia son: *Pochonia*, *Gliocladium*, *Coniothyrium*, *Clamidosporium* e *Idriela*; *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Serratia*, respectivamente. Los principales fitopatógenos en los que se han enfocado los trabajos de control biológico corresponden a los hongos *Fusarium*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, y el oomiceto *Phytophthora*, la bacteria *Erwinia* y los nematodos *Nacobbus*. Actualmente en México están disponibles alrededor de 36 productos comerciales de control biológico, pero se desconoce en su mayoría si son elaborados con antagonistas mexicanos o extranjeros; de las compañías distribuidoras 24 son mexicanas y tres son empresas transnacionales (Barrera, 2006).

#### 4.12. Programa de Arizona con la cepa AF36 no tóxigena

Como ya se había mencionado antes las aflatoxinas son toxinas cancerígenas, son producidas por algunas especies de *Aspergillus* como *A. flavus* y *A. parasiticus*. Desde hace más de 30 años las aflatoxinas son un factor de pérdidas anuales en el cultivo de algodón en Arizona, E.U., equivalentes a cinco millones de dólares o más. La semilla de algodón contaminada que rebasa de las 20 ppb no puede ser utilizada para el alimento bovino, ya que la semilla se utiliza para el alimento de las vacas lecheras. El Dr. Peter Cotty (2008), identificó una cepa de *A. flavus* no productora de aflatoxinas que es la AF36 altamente competitiva con otras cepas de *Aspergillus* aflatoxígenas nativos de suelos de Arizona. Esta cepa se aplicó en campos de Arizona en la producción de algodón para interferir en la contaminación de aflatoxinas, ya que es una de las principales causas por las que sufren pérdidas en la producción. Aunque, esté estrictamente regulada el nivel aflatoxinas se encuentra en una severa desventaja comercial ya que si no se cuenta con las condiciones de almacenamiento óptimas corre el riesgo de seguirse propagándose el hongo, dando como resultado en la aplicación de una reducción en la contaminación en las semillas de algodón. Esta evaluación de la investigación fue observada en los campos comerciales de Yuma, Arizona específicamente durante el periodo 1996-1998 y con base a esta información se registró el producto (USDA ARS, 2008).

La AF36 se formuló en semillas de trigo esterilizadas (el germen y microbios indeseables son eliminados). La semilla de trigo sirve como vehículo y como fuente de alimento del hongo. Para que sea eficaz la AF36 debe crecer en las semillas de trigo y producir los conidios. El crecimiento inicialmente es blanco y algodonoso, ya que cuando los conidios se presentan en un tono verdoso. Los conidios se diseminan por todo el campo para competir con las cepas productoras de aflatoxinas tóxicas. Para que el hongo se desarrolle tiene que haber una humedad adecuada (generalmente suministrado por el riego) y la temperatura (por arriba de 21° C). En teoría, la aplicación de una cepa no tóxigena de *A. flavus* (es decir, AF36) debe presentarse principalmente en los desechos de la cosecha anterior para un mayor desarrollo. Esto proporciona una ventaja en la competencia por los recursos de cultivos durante la infección y crecimiento de la población de *A. flavus* asociada a la producción de cultivos. Sin embargo, la aplicación puede variar dependiendo del tipo de suelo, fecha de

siembra, y las prácticas de riego. Los suelos secos y arenosos pueden requerir un tratamiento posterior (USDA ARS, 2008).

# V. MATERIALES Y MÉTODOS

---

---



Elaboración propia, 2013.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Obtención de cepas de *Aspergillus flavus* y/o *A. parasiticus* no tóxicas

#### 5.1.1. Productos de cacahuete

Para aislar y caracterizar las cepas de *A. flavus* o *A. parasiticus* no productora de aflatoxinas en este trabajo se investigaron en los siguientes 10 productos (Figura, 13), los aislamientos se llevaron a cabo en el laboratorio L1-103 en los edificios de Agrícola.

Muestra	Producto	Procedencia
a	Semillas de cacahuete criollo tipo Virginia	Jalisco, 2013.
b	Cáscara de semillas de cacahuete	Jalisco, 2013.
c	Cacahuates con cáscara	Centro comercial local, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2013.
d	Cacahuates con cáscara	Mercado local, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2013.
e	Cacahuates botaneros	Centro comercial local, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2013.
f	Cacahuates japoneses	Mercado local, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2013.
g	Cacahuates de desayunos escolares	Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2013.
h	Semillas de cacahuete tipo Valencia	Jalisco, 2013.
i	Cacahuates botaneros tostados con cáscara	Puebla, 2013.
j	Suelo	Jalisco, 2013.

Figura 13. Material biológico, productos comerciales de cacahuete. Elaboración propia, 2013.

### **5.1.2. Aislamiento de *Aspergillus Secc. Flavi* a partir de las muestras de cacahuates**

Se realizaron aislamientos del hongo *A. flavus* y *A. parasiticus* para posteriormente realizar la identificación.

Los granos de cacahuete de las semillas y los productos comerciales se desinfectaron superficialmente por 1 min con hipoclorito de sodio al 1%. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada e inmediatamente se escurrieron en sanitas de papel estéril, se colocaron 30 granos ó semillas de cacahuete de cada muestra, en dos cajas con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Todo esto se realizó en la campana de flujo laminar del laboratorio. Las cajas se incubaron a 25° C por 7 días. Las cepas con características típicas de *Aspergillus Secc. Flavi* se aislaron para proceder a su identificación a partir de cultivos monospóricos.

### **5.1.3. Aislamiento de *Aspergillus Secc. Flavi* a partir de suelo**

Para el aislamiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, se realizó el aislamiento del suelo donde se cosecho la semilla de cacahuete, un gramo de suelo se suspendió y se agitó en vórtex por 1 min en agua estéril. De esta suspensión se preparó una serie de diluciones. Un factor final de dilución de  $10^{-4}$  o  $10^{-5}$  se consideró adecuado para el aislamiento de los hongos. Las alícuotas de la dilución final fueron distribuidas en cajas Petri con un medio de agar. Se multiplicó el promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas, por el factor de dilución empleado. Las cepas con características típicas de *Aspergillus secc. Flavi* se aislaron para proceder a su identificación a partir de cultivos monospóricos.

#### 5.1.4. Obtención de las colonias de cultivos monospóricos

Los aislamientos se obtuvieron de colonias a partir de una sola espora por dos métodos: 1) de punta de hifa que consiste en tomar la punta de una hifa observándola en el microscopio de disección y resembrándola en una caja de petri con agar y 2) por el método de diluciones, para que las esporas quedaran aisladas se trabajó con tween al 0.1% y cada colonia resulte de la germinación de una sola espora (Figura 14).

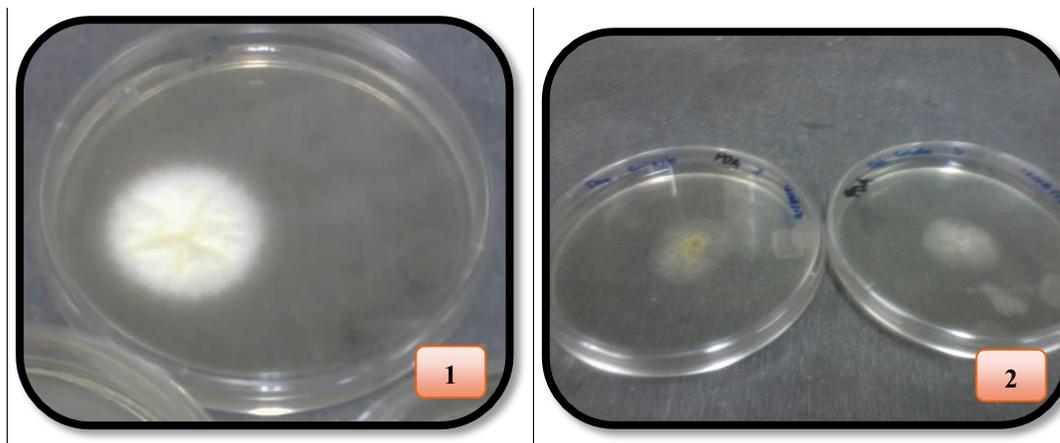


Figura 14. Cultivos monospóricos: 1) Método de diluciones y 2) Punta de hifa. Elaboración propia, 2016.

#### 5.1.5. Aislamientos axénicos e identificación de *Aspergillus* Secc. Flavi aislados de cacahuates

Al término del periodo de incubación se realizaron resiembras de los hongos de *Aspergillus* Secc. Flavi para obtener las cepas puras. Para su identificación se consideró la macro- y micromorfología (ANEXO 1) de las colonias en base a la clave de Maren A. Klich (2002).

Para obtener las medidas de las estructuras microscópicas como vesícula, estípes y conidios, y de la macromorfología de las colonias, se preparó una suspensión de esporas y se sembraron 4  $\mu$ l de la suspensión con una micropipeta en placas de PDA (papa-dextrosa-agar), MEA (extracto de malta-agar), CYA (czapek-extracto de levadura-agar) y MSA (malta-sal-agar) una suspensión de esporas contenida en una gota de tween 20 al 0.1% estéril. Se inoculó en tres puntos equidistantes (Figura 15) y se dejó secar por 30 min. Posteriormente las placas con los diferentes medios de cultivo se incubaron a 25° C por 7 días. Se realizaron 30 mediciones de cada estructura micromorfológica de las muestras.

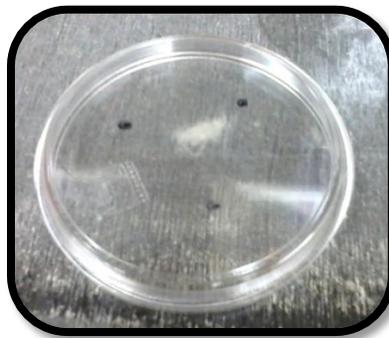


Figura 15. Distribución de colonias en tres puntos equidistantes.  
Elaboración propia, 2016.

#### 5.1.6. Desarrollo de cepas de *Aspergillus* Secc. *Flavi* en medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo (PDA) para determinar la capacidad productora de aflatoxinas de las cepas aisladas. Por lo que se preparó el medio de cultivo, se puede preparar con papas naturales o con el producto comercial deshidratado (Figura 16) en este caso fue con el ultimo, se pesó la cantidad de PDA requerida en este caso fueron 19.5 gr y se aforó en un matraz de 500 ml con agua destilada, se disolvió y se tapó con tapones de gasa, se cubrió con papel aluminio y se selló con cinta *masking tape*. Se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 121 °C a una presión de 15 lb y se mantuvo así 20 min. El medio se vació en las cajas de Petri desechables esteriles. De os cultivos axénicos monosporicos obtenidos de las muestras analizadas fueron sembrads en el medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 °C durante 7 días.



Figura 16. Preparación de medio de cultivo PDA.  
Elaboración propia, 2013.

### 5.1.7. Cuantificación de la producción de aflatoxinas totales en medio PDA de las cepas aisladas

Después de haber pesado las cajas con las cepas, se restó el peso de la caja para realizar los cálculos para la cuantificación. Tomando en cuenta que para 50 gr. corresponden 100 ml de metanol al 80% y 5 g de Cloruro de sodio (NaCl) se calcularon las proporciones. Se licuó el medio de cultivo con la cepa, el metanol y el cloruro de sodio por 1 min., se filtró con papel filtro aflautado en probetas con embudos; del filtrado se tomaron 10 ml y se adicionaron 40 ml de agua destilada. Inmediatamente, se filtró con papel fibra de vidrio en las bombas de extracción tomando 10 ml y se pasaron por la columna de anticuerpos monoclonales (AflaTest®) (Figura 17). Después se lavó la columna con 10 ml de agua destilada dos veces y para finalizar se pasó 1 ml de metanol grado HPLC, recolectándose en un vial. Para realizar la lectura en el fluorómetro VICAM serie 4 se le adicionó 1 ml de la solución reveladora (Bromo) al 1% y se tomó la lectura. Todas las muestras fueron analizadas con base al método aprobado por la AOAC (1995).



**Figura 17. Columnas de anticuerpos monoclonales (AflaTest®).  
Elaboración propia, 2016.**

## 5.2. Fase experimental *in vitro*

### 5.2.1. Material biológico de la prueba *in vitro*

La semilla de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Figura 18) con la que se trabajó fue traído de San Nicolás de las Flores, Jalostotitlán, Jalisco.



Figura 18. Material biológico, semilla de cacahuete.  
Elaboración propia, 2016.

### 5.2.2. Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó por el método de secado en estufa de aire caliente, que se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de la masa de la muestra deseada. Para lo cual se utilizaron cajas de aluminio a peso constante, con aproximadamente 3 g de muestra colocándolas en la estufa a 103° C por 72 horas (Moreno, 1996).

Posteriormente se ajustó el contenido de humedad de las semillas de cacahuete a 15% por equilibrio con una humedad relativa de 90% mantenida en recipientes con una solución saturada de cloruro de potasio, para favorecer el desarrollo de *A. flavus*.

### 5.2.3. Suspensión de esporas para inocular las semillas de cacahuete

La suspensión de esporas se realizó por la técnica de raspado de colonias en agua estéril con Tween 20 al 0.01%, realizando el conteo de esporas con la cámara de Neubauer y se ajustó a  $5 \times 10^5$  esporas/ $\mu$ l.

Las cepas con las que se trabajaron fueron la cepa 3 de *A. flavus* no toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-3) y la cepa 28 de *A. flavus* altamente toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-28). Estas cepas fueron proporcionadas por Moreno-Lara (2004), como parte de su trabajo de tesis de maestría.

### 5.2.4. Diseño experimental de prueba *in vitro*

Las unidades experimentales consistieron en cuatro recipientes con cuatro cajas de Petri con 24 semillas cada una. Se colocaron en una incubadora de precisión durante 14 días a 27° C para el crecimiento del hongo inoculado. El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro tratamientos (Figura 18): T1= Agua destilada (Testigo), T2= Inoculadas con la cepa no toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-3), T3= Inoculadas con la cepa toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-28), T4= Inoculadas con la cepa no toxígena y toxígena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 1:1) y T5= Inoculadas con la cepa no toxígena y toxígena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 100:1) (Figura 19).

La cantidad de inóculo se definió en relación a la concentración natural de esporas que se ha reportado en campos de E. U. con problemas de aflatoxinas.

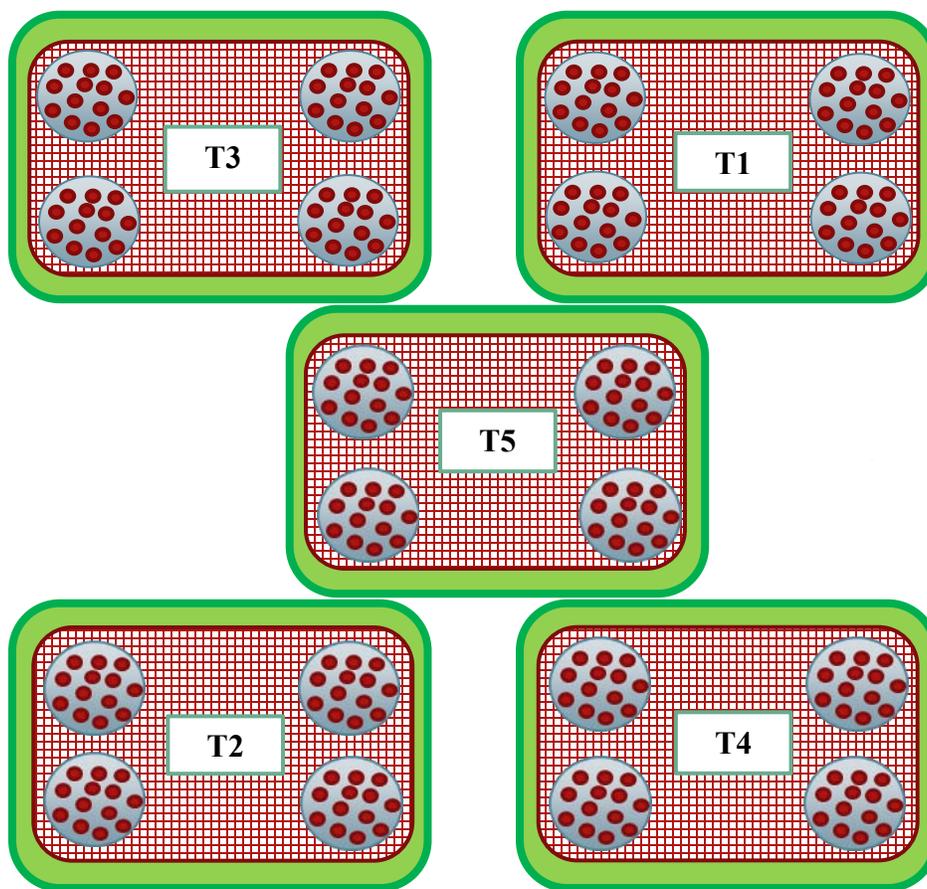


Figura 19. Diseño experimental de la fase *in vitro*.  
Elaboración propia, 2013.

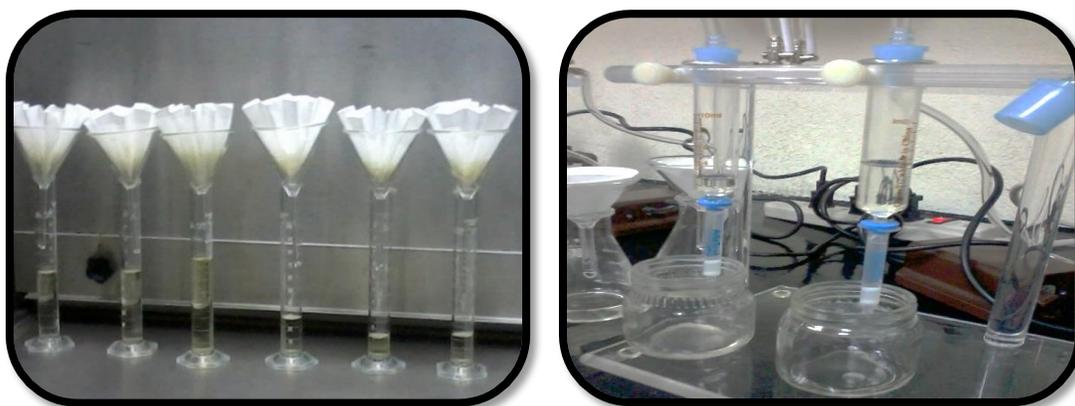
### 5.2.5. Inóculo de la prueba *in vitro*

La inoculación se realizó en la campana de flujo laminar, se hizo una perforación de 3-5 mm a las semillas de cacahuete con un sacabocados, se aplicó la suspensión de esporas ( $5 \times 10^5$  esporas/  $\mu\text{l}$ ) con una micropipeta de cada uno de los tratamientos mencionados en el punto 6.2.4. A las semillas del T1 se inocularon con 1  $\mu\text{l}$  de agua.

### 6.2.6. Cuantificación de aflatoxinas totales por columnas de anticuerpos monoclonales de prueba *in vitro* en las semillas de cacahuete

Las aflatoxinas se determinaron en las semillas de acuerdo al método de extracción con columnas de anticuerpos monoclonales (Figura 20) y cuantificación en fluorómetro aprobado por la AOAC, también incluido en la norma oficial mexicana NOM-188-SSA1-2002.

Las aflatoxinas fueron extraídas mediante la molienda de 25 gr de muestra de cacahuates en una licuadora con 5 gr de cloruro de sodio y 125 ml metanol al 70% por 2 min., el extracto se filtró a través de papel filtro aflautado de 24 cm Ø Whatman No. 1 en probetas de 100 ml y embudos de 100 mm Ø de vidrio, del filtrado se tomaron 25 ml y se diluyeron en 50 ml de agua destilada en matraces Erlenmeyer de 125 ml, la preparación diluida paso por un segundo filtrado con papel filtro de fibra de vidrio de 11 cm Ø Whatman con un embudo de vidrio de 60 mm Ø. Del filtrado se tomaron 30 ml y se pasarón a través de una columna de inmunoafinidad AflaTest® con anticuerpos monoclonales específicos para aflatoxinas las cuales fueron colocadas en cada una de las bombas (Figura 20). En este estado la aflatoxina se liga al anticuerpo de la columna. Posteriormente la columna es lavada dos veces con 10 ml de agua para eliminar impurezas. Para finalizar la extracción de las aflatoxinas totales (AF) se pasó por la columna 1 ml de metanol grado HPLC, las aflatoxinas son removidas del anticuerpo a un vial, se toma el extracto y se toma lectura en el fluorómetro se le adicionó 1 ml de solución reveladora (solución de bromo al 0.002%) que se preparó el día que se utilizó, se pasó por el vórtex y se realizó la cuantificación en el fluorómetro (VICAM serie 4) después de transcurridos 60 segundos se toma lectura de cada una de las muestras.



**Figura 20. Extracción de aflatoxinas totales: Izq. Filtrado del extracto. Der. Bombas con la columna de inmunoafinidad AflaTest®.**  
Elaboración propia, 2016.

### 5.3. Fase experimental en invernadero

#### 5.3.1. Material biológico de la prueba en invernadero

Las semillas que se utilizaron para sembrar en condiciones de invernadero fueron cacahuates criollos tipo Virginia de porte erecto, de vainas y semillas grandes procedentes de San Nicolás de las Flores, Jalostotitlán, Jalisco, cosechada en el mes de julio de 2013. Las semillas sin cáscara fueron conservadas a temperatura ambiente, en frascos hasta su siembra.

#### 5.3.2. Prueba de germinación de cacahuete

Para conocer la viabilidad de las semillas de cacahuete, se realizó la prueba de germinación. Se determinó con un lote de 240 semillas (tres repeticiones de 80 semillas) de cada unidad experimental, en toallas de papel anchor húmedas enrolladas, incubadas a 25 °C durante 7 días (ISTA, 1996).

#### 5.3.3. Siembra de plantas de cacahuete

El experimento se montó en el invernadero ubicado en la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS) en Cuautitlán Izcalli, Edo. de México (Figura 21). Las muestras de semilla de cacahuete pertenecen al ciclo agrícola Primavera-Verano. La temperatura promedio durante el desarrollo de las plantas fue de 28 °C, registrando la temperatura de máxima-mínima cada tercer día.



Figura 21. Izq. Invernadero de UNIGRAS. Der. Unidades experimentales, macetas.  
Elaboración propia, 2016.

Las unidades experimentales consistieron de macetas (bolsas negras de 5 kg) con tres semillas. El sustrato de cada maceta estuvo compuesto de una combinación de peat-moss con tepojal (3:1), previamente esterilizado en la autoclave a una temperatura de 121 °C con una presión de 15 lb en 20 min (Figura 22).



**Figura 22. Sustrato combinación peat-moss/tepojal.  
Elaboración propia, 2016.**

#### **5.3.4. Suspensión de esporas para inocular las plantas de cacahuete**

La cantidad de inóculo utilizado se eligió en relación a la concentración natural de esporas  $5 \times 10^5$  que se ha reportado en campos de E. U. con problemas de aflatoxinas (Cotty, 1994).

#### **5.3.5. Diseño experimental en invernadero**

Se realizaron pruebas de competencia con *A. flavus* UNIGRAS-3 como biocontrol y *A. flavus* UNIGRAS-28 en plantas de cacahuete, cultivadas en macetas en el invernadero.

Se siguió un diseño experimental de bloques al azar con cuatro tratamientos: T1= Agua destilada, T2= Inoculadas con la cepa toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-28), T3= Inoculadas con la cepa no toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-3) y T4= Inoculadas con ambas cepas (combinación *A. flavus* UNIGRAS-3/ *A. flavus* UNIGRAS-28) a una proporción 6:1; (Figura 23) con 5 repeticiones con tres plantas.

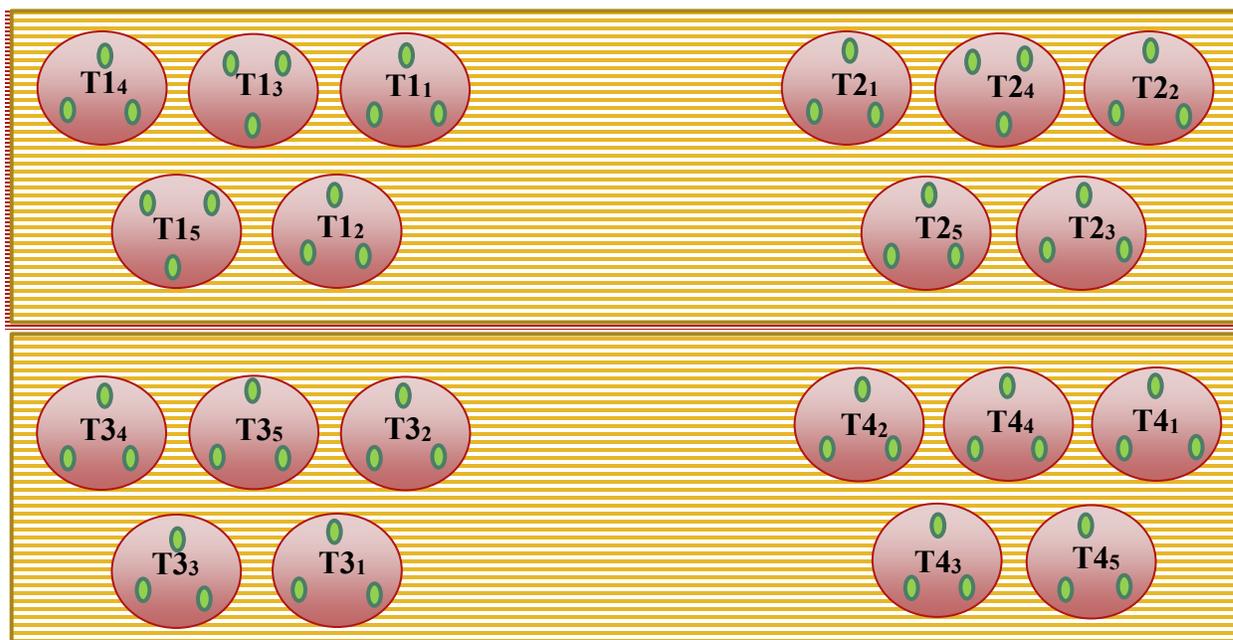


Figura 23. Diseño experimental en invernadero.  
Elaboración propia, 2016.

La evaluación del daño fisiológico en las plantas atribuible a la inoculación de las cepas, se llevó a cabo por la estimación del porcentaje de germinación y vigor de las semillas, cantidad de frutos producidos, peso fresco y seco de las plantas, tamaño final de las plantas de cacahuete.

### 5.3.6. Inoculación de las plantas con los tratamientos

La inoculación se realizó en el invernadero, después de que emergieron las plantas de cacahuete, se dejaron crecer aproximadamente 15 cm para desenterrarlas y aplicarles el inóculo, se aplicó la suspensión de esporas ( $5 \times 10^5$  esporas/  $\mu\text{l}$ ) pero esta fue licuada con medio de cultivo PDA para una mayor retención del inóculo en el sustrato de cada uno de los tratamientos mencionados en el punto 6.3.5. a las plantas.

### 5.3.7. Determinación de aflatoxinas por la prueba de ROSA® FAST Aflatoxin Quantitative CHARM SCIENCES, INC

Se utilizó esta prueba por la cantidad de frutos obtenidos de las plantas que eran de 20 gr aproximadamente, después de haber realizado el tostado de los cacahuates. Se pesaron 10 g de cada muestra y se licuaron con 20 ml de metanol al 70% por 1 min, después se dejó reposar

2 min e inmediatamente se tomó 1 ml de la muestra, se colocaron en tubos eppendorf para centrifugar por 1 min a 3000 rpm a una temperatura de 16°C en la centrífuga (Eppendorf 5417R). Posteriormente, de los tubos se extrajeron 100 µl para diluirlo en otro tubo con 1.0 ml de AFQ Buffer y finalmente se filtró. Se aplicaron 300 µl del extracto diluido en las tiras y se incubaron 5 min a 35°C previo a la lectura de los resultados (Figura 24).



Figura 24. Prueba de ROSA® FAST aflatoxin quantitative CHARM SCIENCES, INC.

Fuente: Elaboración propia, 2013.

### 5.3.8. Determinación de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales en los frutos de cacahuete, por el método de Folin-Ciocalteu. Se pesaron 250 mg en un tubo para centrífuga de los cacahuates molidos de cada tratamiento, se le agregó 1 ml de metanol al 80%, se agitó en el vórtex por un 1 min., se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min., se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro microtubo, a la pastilla (pellet) de cacahuete se le agregaron 500 µl de metanol al 100%, de nuevo se agitó en el vórtex 1 min., para centrifugar la muestra a 10 000 rpm durante 15 min., se recuperó el sobrenadante y se transfirió al microtubo que contenía el sobrenadante obtenido de la primera centrifugación. Se ajustó el volumen a 2 ml con metanol absoluto, los microtubos siempre estuvieron protegidos de la luz. Para finalizar la determinación de fenoles se preparó la curva patrón (ANEXO 2). Se mezclaron 1500 µl de agua con 200 µl de la muestra, 200 µl de una solución de carbonato de sodio al 20% y 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, la mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente y protegida de la luz, transcurrido el tiempo se registró la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. La

cuantificación se realizó por medio de una curva estándar de ácido gálico con el fin de expresar los resultados en equivalentes de este compuesto, realizando los siguientes cálculos (Trejo, 2010).

$$\text{Ácido gálico (mg/ml)} = ((D.O. + b)/m) * FD$$

**Donde:**

b= ordenada al origen

m= pendiente

FD= factor de dilución

### **5.3.9. Análisis estadístico**

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico de varianza (ANOVA) y se aplicaron pruebas de rango múltiple (Tukey) para establecer una diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) y obtener la comparación de medias entre los diferentes tratamientos, utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism 5.0.

# VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---



Elaboración propia, 2016.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Descripción de las especies de *Aspergillus Secc. Flavi* encontradas en los aislamientos de las muestras de cacahuate

En las micobiotas obtenidas a partir de las diferentes muestras se encontraron aislamientos de *A. flavus* que a continuación se describen.

#### 6.1.1. *Aspergillus flavus* Link

➔ Características de las colonias en medios de cultivo (Figura 25).

Los conidios en CYA25 son de color verde profundo, verde oliva o simplemente oliva, las cepas obtenidas una coloración amarilla; esclerocios, en las cepas que los presentaron fueron de color marrón oscuro a negro, variables en forma y tamaño; presentaron exudado incoloro a marrón; con reverso sin color, marrón opaco o anaranjado; variable en la textura de la colonia, generalmente de 2-3 mm de profundidad, lanoso a flocoso. En MEA los conidios son oliva u ocasionalmente verde oscuro (Klich, 2002), las cepas aisladas presentaron micelio blanco o poco visible; esclerocios algunas veces presentes, café o negros, forma y tamaño variables; generalmente incoloro al reverso o algunas veces de color amarillo pálido; especialmente flocosas al centro de la colonia. La morfología de las colonias en CZ es similar a las de CYA25 (Klich, 2002).

Se realizó la identificación de la micromorfología de las cepas de cacahuate, por lo que se obtuvieron promedios de las 30 mediciones de las estructuras, realizadas a cada cepa y se reportaron en la siguiente tabla (Tabla 12).

En relación a la identificación de la medición de estructuras y las características observadas en la macromorfología, se concluye que las cepas encontradas en los productos de cacahuate pertenecen a la especie *A. flavus*, de acuerdo a la descripción de Klich (2002). Cabe destacar que *A. parasiticus* no estuvo presente en las muestras analizadas siendo que este hongo está reportado como la principal especie productora de micotoxinas en el cacahuate y en el suelo que se cultiva tal como lo menciona Diener (1989).

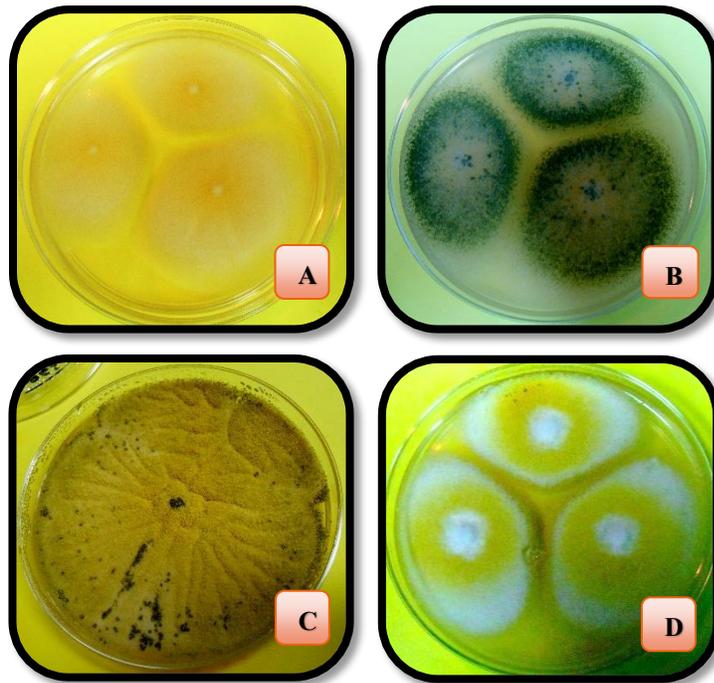


Figura 25. *Aspergillus flavus*: Colonias de A) CYA25, B) MEA, C) CYA37, D) PDA, 7 días de incubación.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 12. Medición de estructuras micromorfológicas de *A. flavus*.**

CEPAS	Diámetro de colonia (mm)			Estipe		Vesícula		Seriación	Conidios		
	CYA25	MEA	PDA	Longitud (µm)	Textura de la superficie	Diámetro (µm)	Forma		Longitud (µm)	Forma	Textura de la superficie
<b>a</b>	56-57	67-70	60-62	474-645	fr	22-41	gl/el	u/b	3.2-4.2	gl/el	l/fr
<b>b</b>	56-60	71-72	60-64	474-723	fr	20-42	gl/el	u/b	3.2-4.2	gl/el	l/fr
<b>c</b>	59-60	66-70	55-58	616-895	fr	20-37	gl/el	u/b	3.2-4.1	gl/el	l/fr
<b>d</b>	57-58	68-70	57-60	593-833	fr	20-35	gl/el	u/b	4-4.8	gl	l/fr
<b>e</b>	55-57	64-67	56-60	553-806	l	23-37	gl	u/b	3.2-4	gl/el	l/fr
<b>f</b>	54-55	64-65	57	403-858	fr	20-35	gl/el	u/b	3.2-4	gl/el	l/fr
<b>g</b>	68-78	62-64	38-41	435-718	l	26-31	gl/el	u/b	4-4.2	gl	l
<b>h</b>	67-75	60-67	46-48	553-783	l/fr	23-39	gl/el	u/b	4	gl	l
<b>i</b>	67-73	60-65	49-51	435-758	l	20-38	gl/el	u/b	4	gl	l
<b>j</b>	72-80	68-69	52-54	403-677	fr	20-38	gl/el	u/b	3.2-4.2	gl/el	l/fr

Nota: fr= finamente rugoso, l= liso, gl=globoso, el= elipsoidal, u= uniseriado, b=biseriado (a= semillas de cacahuete criollo tipo Virginia provenientes de Jalisco; b= cáscara de las semillas de cacahuete criollo tipo Virginia provenientes de Jalisco; c= cacahuates de centro comercial local con cáscara; d= acahuates del mercado local con cáscara; e= acahuates salados; f= acahuates japoneses; g= cacahuates de desayunos escolares; h= semillas de cacahuete tipo Valencia; provenientes de Jalisco; i= cacahuates tostados con cáscara de Puebla y j= suelo de Jalisco donde estaba sembrado el cacahuete) Tukey P<0.05. Elaboración propia, 2016.

### 6.1.2. Resultados de la cuantificación de aflatoxinas de las cepas aisladas de las muestras de cacahuete

En relación a la capacidad de producción de aflatoxinas de cada aislamiento, se encontraron los resultados que se reportan a continuación (Figura 26).

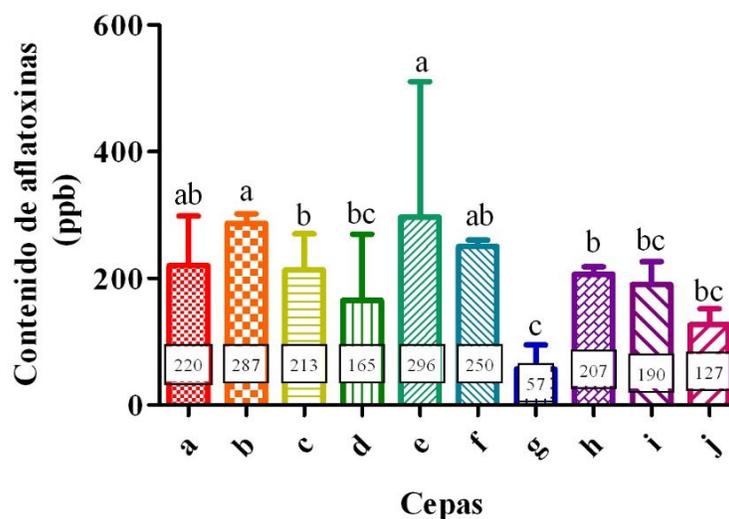


Figura 26. Producción de aflatoxinas en productos de cacahuete (a= semillas de cacahuete criollo tipo Virginia provenientes de Jalisco; b= cáscara de las semillas de cacahuete criollo tipo Virginia provenientes de Jalisco; c= cacahuates de centro comercial local con cáscara; d= acahuates del mercado local con cáscara; e= acahuates salados; f= acahuates japoneses; g= cacahuates de desayunos escolares; h= semillas de cacahuete tipo Valencia; provenientes de Jalisco; i= cacahuates tostados con cáscara de Puebla y j= suelo de Jalisco donde estaba sembrado el cacahuete) Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

Se observaron diferencias en la capacidad de producción de AF entre las cepas. La cepa **a**, **b**, **e** y **f**, fueron altamente productoras de la toxina. A diferencia de éstas, la cepa **g** fue la que presentó la menor producción de aflatoxinas. El resto de las cepas se pueden considerar en un nivel intermedio. Esto concuerda con los resultados de Moreno-Lara (2004) quien reportó una amplia variación en la capacidad micotoxigénica de las cepas. Sin embargo cabe mencionar que ninguna cepa fue no productora y por lo tanto no se obtuvo ninguna cepa que se pudiera utilizar como biocontrol en este trabajo.

## 6.2. Fase experimental *in vitro*

### 6.2.1. Invasión de *A. flavus* en las semillas de cacahuete inoculadas *in vitro*

Para la evaluación de la competencia entre la cepa no productora y las productoras de *A. flavus* en las cajas de Petri, se utilizó una escala de severidad del crecimiento del hongo sobre las semillas. Los niveles de la escala fueron los siguientes: 0= sin crecimiento fúngico, 1= 1% de la semilla cubierta con el hongo, 2= 25% de la semilla cubierta con el hongo, 3= 50% de la semilla cubierta con el hongo y 4=100% de la semilla cubierta con el hongo. Además se registró el porcentaje de semillas en cada nivel de la escala (Tabla 13):

**Tabla 13. Escala de severidad de *A. flavus* en las semillas de cacahuete inoculadas.**

CACAHUATE	Escala de Severidad (%)					Nivel predominante
	0	1	2	3	4	
T1	40	34	11	11	4	0
T2	1	38	19	29	13	1
T3	4	14	9	42	31	3
T4	0	22	19	46	13	3
T5	3	35	35	18	9	1,2

**Nota:** T1= Agua destilada (Testigo); T2= Inoculadas con la cepa no toxígena (UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa toxígena (UNIGRAS-28); T4= Inoculadas con la cepa no toxígena y toxígena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 1:1) y T5= Inoculadas con la cepa no toxígena y toxígena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 100:1). Elaboración propia, 2016.

Como se puede observar en la tabla, el T1 tuvo un 40% del nivel 0, pero sí se llegaron a observar algunas cabezuelas de *A. flavus*, y se registró el 34% de semillas en el nivel 1. En relación al biocontrol T2 se observó la presencia del hongo en un 38% del nivel 1, lo cual refleja que la cepa UNIGRAS-3 no es muy agresiva. En el T3 y T4 los porcentajes fueron similares de 42% y 46% del nivel 3. En el T5 el 35% de las semillas se clasificaron en el nivel 1 y el otro 35% en el nivel 2, en el nivel 3 se registró un 18% y en el nivel 4 solo un 9%. Como Horn (2005) menciona en relación a la colonización de *Aspergillus* en semillas de cacahuete, la competencia entre saprofitos puede variar en relación a las temperaturas a las cuales las semillas estuvieron sometidas. Para darle una estandarización a la prueba *in vitro* se trabajó con las mismas temperaturas y las mismas condiciones. Por los resultados anteriores se concluye que *A. flavus* UNIGRAS-28 fue más agresiva que *A. flavus* UNIGRAS-3 en estas condiciones. Además se comprobó la competencia

entre *A. flavus* UNIGRAS-3 y *A. flavus* UNIGRAS-28 ya que en el T4 solo se obtuvo el 13% del nivel 4 en comparación al 31% de este nivel con el T3. La proporción entre las cepas competidoras es importante para ver un efecto de biocontrol. Con la proporción 100:1 se logró reducir el número de semillas invadidas severamente por el hongo como se observa en el T5 (Figura 27).

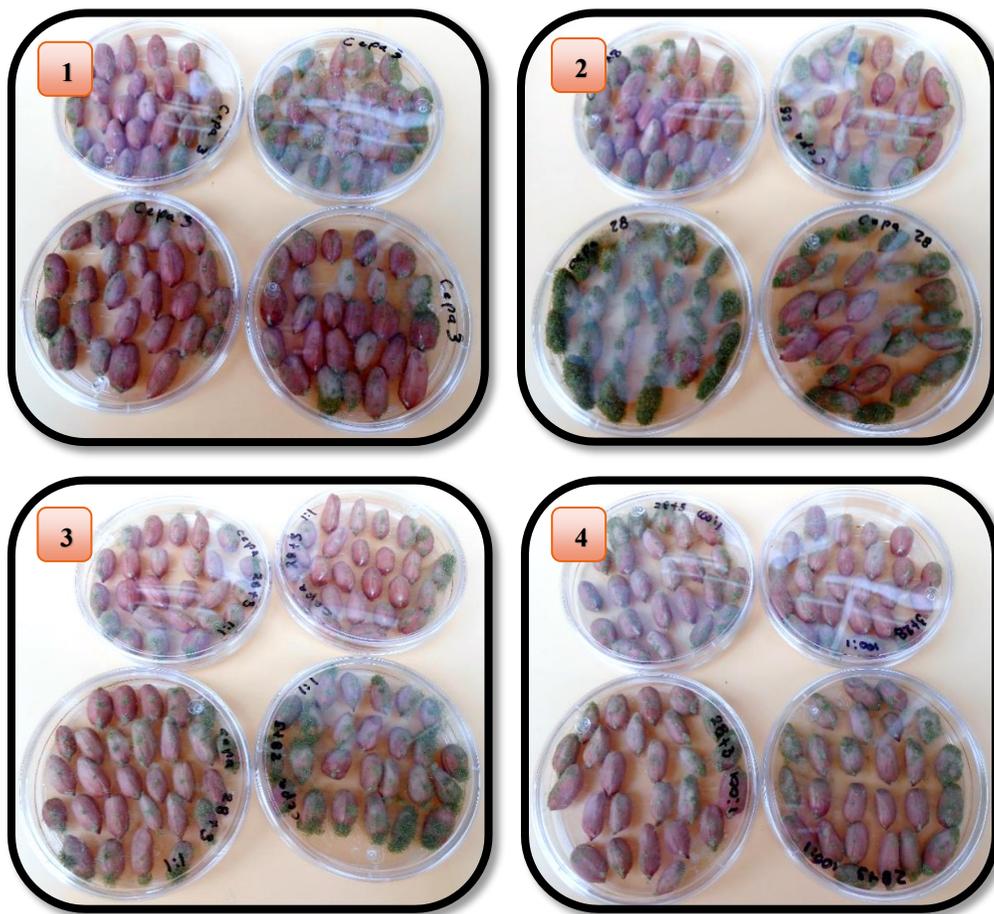


Figura 27. Cajas de Petri con semillas inoculadas. 1) *A. flavus* UNIGRAS-3; 2) *A. flavus* UNIGRAS-28); 3) Combinación de *A. flavus* UNIGRAS-3/*A. flavus* UNIGRAS-28 en una proporción 1:1 y 4) Combinación de UNIGRAS-3/ *A. flavus* UNIGRAS-28 en una proporción 100:1. Elaboración propia, 2016.

### 6.2.2. Cuantificación de aflatoxinas totales por columnas de anticuerpos monoclonales en cacahuates inoculados de la prueba *in vitro*

Después de haber observado el porcentaje de infección de las semillas de cacahuate en la prueba *in vitro* (7.2.1) se realizó la determinación de AF totales de cada tratamiento, (Figura 28):

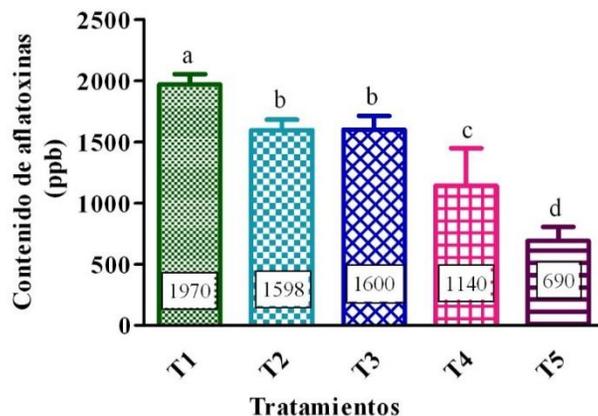


Figura 28. Producción de aflatoxinas en cacahuates *in vitro* con *A. flavus* [T1= Agua destilada (Testigo), T2= Inoculadas con la cepa no tóxigena (UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa tóxigena (UNIGRAS-28); T4= Inoculadas con la cepa no tóxigena y tóxigena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 1:1) y T5= Inoculadas con la cepa no tóxigena y tóxigena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 100:1)] Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

En el T1 el contenido de AF totales fue mayor aunque las semillas no fueron inoculadas, como se mencionó antes, la semilla estaba contaminada con *A. flavus* de manera natural. En el T2 y T3 no se observó diferencias significativas. En el T4 se observó una reducción de los niveles de AF siendo significativamente diferente en relación a los demás tratamientos. En el T5 se observó una menor concentración de AF que en los demás tratamientos, siendo significativamente diferente. De acuerdo a los resultados anteriores podemos afirmar que *A. flavus* UNIGRAS-3 pudo disminuir la contaminación de las semillas con AF en las condiciones *in vitro*, principalmente en la proporción 100:1. Es importante mencionar que *A. flavus* UNIGRAS-3 es un buen biocontrol tanto para *A. flavus* UNIGRAS-28 como para las cepas de *A. flavus* que se encontraron de manera natural en la semilla.

### 6.3. Fase experimental en invernadero

Al finalizar el desarrollo vegetativo de nuestro cultivo de cacahuete en el invernadero se procedió a sacar las plantas y desenterrarlas para poder realizar las mediciones de altura de la planta, el peso que tenían en ese momento cada uno de los tratamientos y realizar el secado en la estufa, tanto de la planta como de los frutos.

#### 6.3.1. Caracterización de plantas de cacahuete inoculadas en invernadero

Los resultados obtenidos en la evaluación de las características fisiológicas de las plantas se presentan a continuación. En relación a la altura de las plantas de cacahuete, está no se vio afectada en las plantas de ninguno de los tratamientos y no hubo diferencia significativa entre ellos, (Figura 29):

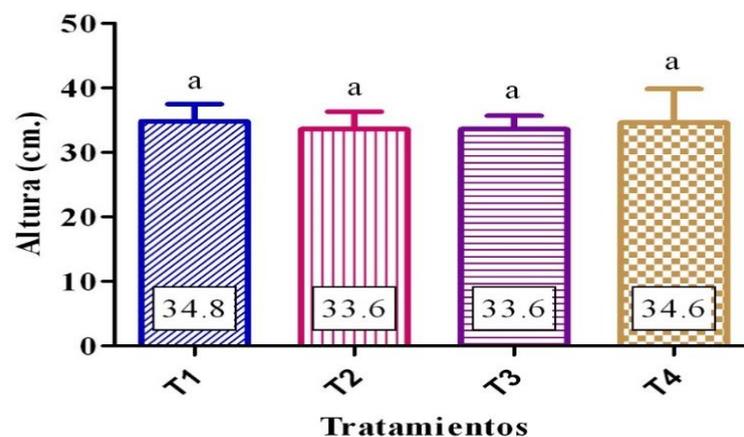


Figura 29. Altura de las plantas de cacahuete inoculadas con *A. flavus* en invernadero [T1= Agua destilada (Testigo); T2= Inoculadas con la cepa no tóxigena (*A. flavus* UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa tóxigena (*A. flavus* UNIGRAS-28) y T4= Inoculadas con la cepa no tóxigena y altamente tóxigena (combinación *A. flavus* UNIGRAS-3/ *A. flavus* UNIGRAS-28 a una proporción 6:1)] Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

Estadísticamente en relación a la altura de las plantas no se observó diferencias significativas, por lo que en ninguno de los tratamientos se vio afectado su desarrollo por *A. flavus* UNIGRAS-3 y *A. flavus* UNIGRAS-28, entonces el biocontrol no afecta las características fisiológicas de la planta, pero cabe resaltar que en las plantas inoculadas con *A. flavus* UNIGRAS-28 es tuvieron lesiones sus tallos.

### 6.3.2. Peso fresco de plantas y frutos del cacahuate inoculadas en invernadero

Para obtener el peso fresco, se pesaron las plantas de cacahuate de cada tratamiento con sus repeticiones, después de haberlas desenterrado y haberles retirado toda la tierra. Los resultados fueron los siguientes (Figura 30):

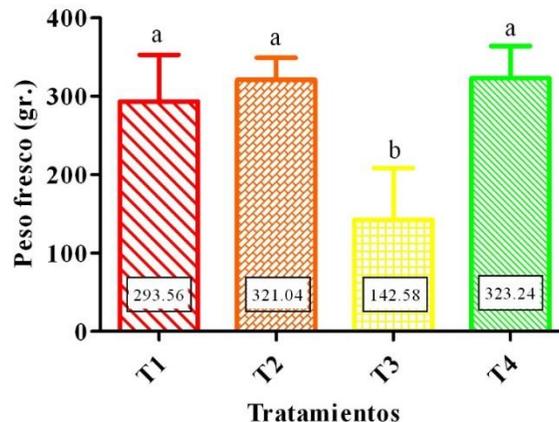


Figura 30. Pesos fresco de las plantas de cacahuate inóculadas con *A. flavus* en invernadero [T1= Agua destilada (Testigo); T2= Inoculadas con la cepa no tóxigena (UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa tóxigena (UNIGRAS-28) y T4= Inoculadas con la cepa no tóxigena y altamente tóxigena (combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 a una proporción 6:1)] Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

En relación al vigor de las plantas del T2, se puede observar que hubo un aumento en el peso en comparación del T1. Pero en el T3 el efecto de la cepa altamente tóxigena es muy notable, ya que los daños ocasionados por el hongo fueron observados en las características de la planta tanto en peso fresco, como en el vigor de los tallos y la coloración de las hojas. En relación al T4 el peso fue similar a los tratamientos T1 y T2, por lo que se ve el efecto que tiene *A. flavus* UNIGRAS-3 que es el biocontrol. La cepa no tóxigena, compitió con *A. flavus* UNIGRAS-28 y disminuyó el efecto adverso que tiene ésta sobre el vigor de las plantas (Figura 30).



Figura 31. Plantas de cacahuete en invernadero, 1) Testigo; 2) *A. flavus* UNIGRAS-3 biocontrol; 3) *A. flavus* UNIGRAS-28 altamente toxígena y 4) Combinación *A. flavus* UNIGRAS-3/ *A. flavus* UNIGRAS-28 a una proporción 6:1. Elaboración propia, 2016.

En cuanto al peso de los frutos obtenidos de cada uno de los tratamientos después de realizar la prueba estadística se obtuvieron los siguientes datos (Figura 31):

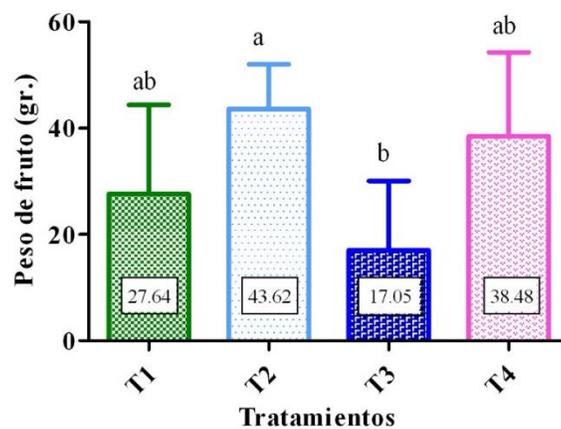


Figura 32. Pesos fresco de los frutos de cacahuete producidos en plantas inóculadas con *A. flavus* en invernadero [T1= Agua destilada (Testigo; T2= Inoculadas con la cepa no toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa toxígena (*A. flavus* UNIGRAS-28) y T4= Inoculadas con la cepa no toxígena y altamente toxígena (combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 a una proporción 6:1)] Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

Nuevamente la aplicación de la cepa no tóxigena incremento el peso de los frutos de cacahuate. Y en relación a los frutos del T3, se observó que disminuyó la cantidad de cacahuates obtenidos con *A. flavus* UNIGRAS-28. Ya que el inóculo fue colocado en el suelo pudo haber sido un factor de contaminación directa de la cepa altamente tóxigena con los frutos. En el T4 la cantidad de los frutos no se vio afectado ya que los datos son similares a las del T1 y T2. Entonces la aplicación de *A. flavus* UNIGRAS-3 tanto en el T2 y T4 favoreció el desarrollo de los frutos de cacahuate tanto en cantidad como en sus características fisiológicas (Figura 33).



Figura 33. Frutos de cacahuate cosechados, 1) Testigo; 2) *A. flavus* UNIGRAS-3 biocontrol; 3) *A. flavus* UNIGRAS-28 altamente tóxigena y 4) Combinación *A. flavus* UNIGRAS-3/ *A. flavus* UNIGRAS-28 a una proporción 6:1. Elaboración propia, 2016.

### 6.3.3. Peso seco de plantas y frutos de cacahuates inoculadas en invernadero

Después de haber realizado el secado de las plantas en bolsas de papel de estraza y los frutos en sobres de papel con ventilación, por 72 hrs a una temperatura de 103° C para cada tratamiento con sus repeticiones, se volvieron a pesar para realizar la comparación de datos en relación a su peso fresco (Figura 34).

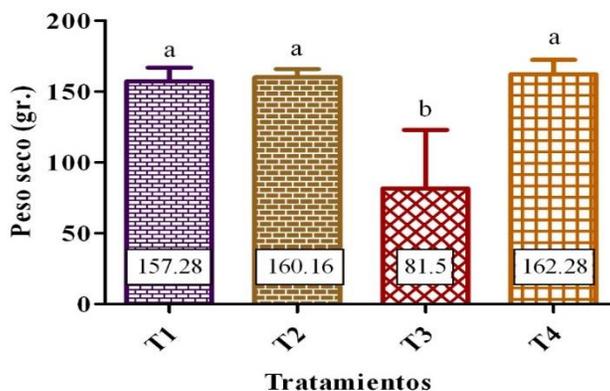


Figura 34. Pesos seco de las plantas de cacahuete inóculadas con *A. flavus* en invernadero [T1= Agua destilada (Testigo); T2= Inoculadas con la cepa no toxígena (UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa toxígena (UNIGRAS-28) y T4= Inoculadas con la cepa no toxígena y altamente toxígena (combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 a una proporción 6:1)] Tukey P<0.05. Elaboración propia, 2016.

En el T1, T2 y T4 se obtuvieron las cifras más altas de peso seco, sin diferencia estadística entre ellos. Pero en el T3 seguimos observando los mismos efectos de la cepa altamente toxígena, ya que este tratamiento fue el que menor peso presentó. Entonces en relación a la aplicación de la cepa no toxígena, se observó que compitió con la cepa altamente productora, y redujo el efecto negativo sobre el vigor y el peso de la planta (Figura 34).

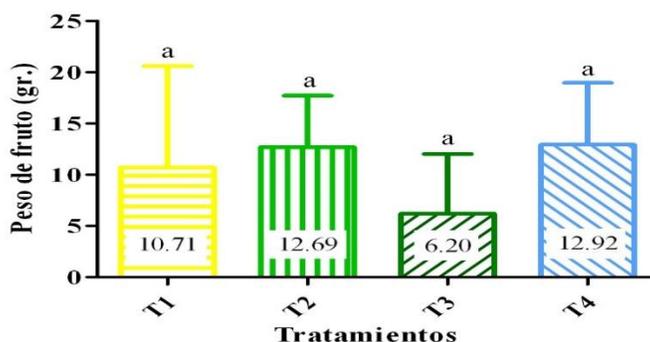


Figura 35. Pesos seco de frutos de cacahuete producidos en plantas inóculadas con *A. flavus* en invernadero [T1= Agua destilada (Testigo); T2= Inoculadas con la cepa no toxígena (UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa toxígena (UNIGRAS-28) y T4= Inoculadas con la cepa no toxígena y altamente toxígena (combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28) a una proporción 6:1)] Tukey P<0.05. Elaboración propia, 2016.

Los datos son congruentes con los resultados del peso fresco de los frutos, sin embargo no hubo diferencia estadística entre los tratamientos (Figura 35), si bien se observa un peso seco promedio menor en el T3 (Figura 36).



**Figura 36.** Peso seco de cacahuates cosechados, 1) Testigo; 2) UNIGRAS-3 biocontrol; 3) UNIGRAS-28 altamente tóxica y 4) Combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 a una proporción 6:1. Elaboración propia, 2016.

#### 6.3.4. Cuantificación de aflatoxinas totales por la prueba de ROSA® FAST Aflatoxin Quantitative CHARM SCIENCES, INC en los cacahuates inoculados en invernadero

En relación a los niveles de contaminación con aflatoxinas en los cacahuates inoculados en invernadero, se encontraron los siguientes resultados (Figura 37):

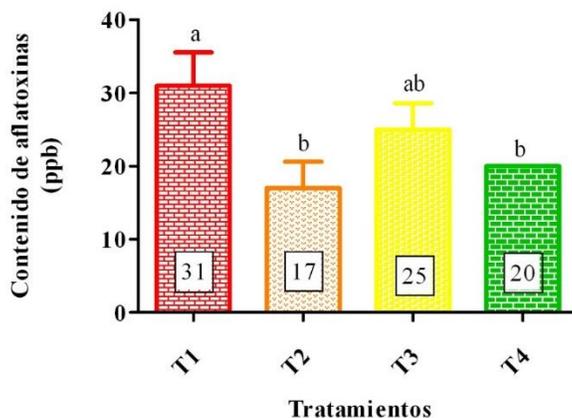


Figura 37. Producción de aflatoxinas en cacahuates de plantas inóculadas en invernadero con *A. flavus* [T1= Agua destilada (Testigo); T2= Inoculadas con la cepa no tóxigena (UNIGRAS-3); T3= Inoculadas con la cepa tóxigena (UNIGRAS-28) y T4= Inoculadas con la cepa no tóxigena y altamente tóxigena (combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 a una proporción 6:1)] Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

Se observaron diferencias significativas en la producción de AF en los frutos de cada tratamiento. En el T1 se observa que su contenido de AF fue mayor (31 ppb) porque venía contaminada naturalmente la semilla con *A. flavus*. A diferencia de éste, el T2 fue el que presentó menor producción de aflatoxinas (17 ppb) y el T3 (25 ppb) fue estadísticamente igual al T1. Y el T4 disminuyó (20 ppb) más en comparación con los tratamientos T1 y T3. Todo lo anterior nos indica que el biocontrol fue aplicado de manera benéfica para los frutos de cacahuete y por lo tanto disminuyó la contaminación por AF en el producto final.

### 6.3.5. Determinación de Fenoles Totales de los frutos de cacahuete en seco

En los cacahuates obtenidos de las plantas inoculadas en invernadero se observó una diferencia en la coloración de los cacahuates, siendo que estuvieron las mismas horas y temperatura para cada uno de los tratamientos. Los cacahuates a pesar de que se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura T3 presentaron una coloración café más oscura en comparación con los demás tratamientos. Este cambio de color puede atribuirse a diversos factores, entre ellos a la actividad de la polifenoloxidasa. Esta enzima junto con la peroxidasa forma polifenoles para reforzar las paredes celulares como respuesta al ataque de patógenos para dificultar su acceso hacia el interior celular (Badui, 1999). Después de haberlos molido para la cuantificación de aflatoxinas totales y en base a la determinación de fenoles totales. Dado que la técnica utilizada en este trabajo no implica el uso de enzimas que liberen fenoles covalentemente unidos a otros componentes de pared celular, los resultados nos señalaron los niveles de fenoles solubles en cada tratamiento (Figura 38):

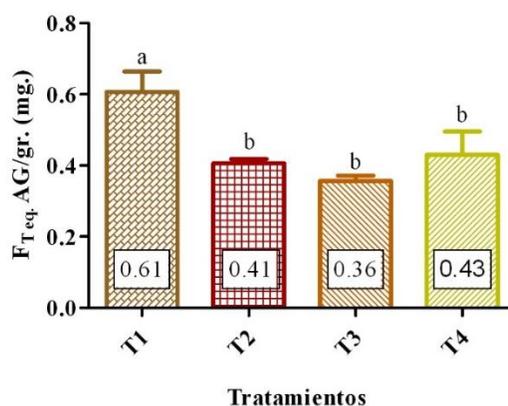


Figura 38. Fenoles totales en cacahuates de plantas inoculadas con *A. flavus* [T1= agua destilada (Testigo); T2= inoculadas con la cepa no toxígena (UNIGRAS-3); T3= inoculadas con la cepa toxígena (UNIGRAS-28) y T4= inoculadas con la cepa no toxígena y toxígena (combinación de UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 en una proporción 1:1] Tukey  $P < 0.05$ . Elaboración propia, 2016.

Los resultados obtenidos en relación a los fenoles totales de los cacahutes molidos podemos observar que estadísticamente el T1 es mayor a los tratamientos T2, T3 y T4. Estos resultados nos sugiere que en presencia de *A. flavus* hubo respuesta de la actividad enzimática utilizando como sustrato fenoles y por lo tanto se observó una disminución en el contenido de fenoles en los tratamientos con *A. flavus*. Aunque no hubo diferencias significativas entre T2, T3 y T4, en el T3

se observa tendencia en la disminución del contenido de fenoles totales. En la figura 37 podemos observar que se obtuvieron niveles numericamente mayores de fenoles en T4, en el que aprecia una competencia entre ambas cepas y la cepa UNIGRAS-3 redujó nuevamente el efecto negativo de la cepa altamente toxígena.

En los resultados obtenidos en este trabajo se observó la presencia de aflatoxinas que afectó tanto la calidad sanitaria de los cacahuates, como su fisiología y vigor del cultivo (Figura 39).



**Figura 39.** Coloración de cacahuates molidos para la determinación de fenoles totales, 1) Testigo; 2) UNIGRAS-3 biocontrol; 3) A. UNIGRAS-28 altamente toxígena y 4) Combinación UNIGRAS-3/UNIGRAS-28 a una proporción 6:1. Elaboración propia, 2016.

# VII.CONCLUSIONES

---

---



Elaboración propia, 2016.

## VII. CONCLUSIONES

---

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. En las muestras de cacahuete analizadas se encontraron con una alta incidencia de cepas de *Aspergillus flavus* tanto en los productos elaborados a base de cacahuete, como en las muestras de semillas y en el suelo de cultivo de cacahuete que se analizaron. Por lo que lo *A. flavus* fue la especie predominante.
2. El efecto de *A. flavus* UNIGRAS-3 en la fase *in vitro* redujo la concentración de aflatoxinas totales en las semillas de cacahuates inoculadas en relación directa a la cantidad de inóculo del biocontrol.
3. La concentración de aflatoxinas en los frutos de cacahuete disminuyó con la aplicación de la cepa *A. flavus* UNIGRAS- 3 en plantas en condiciones de invernadero.
4. Se comprobó que las plantas inoculadas con la cepa *A. flavus* UNIGRAS-28 presentaron un mayor daño fisiológico en tallos, hojas y frutos, así como menor producción de frutos y mayores concentraciones de aflatoxinas.
5. El peso fresco y seco de las plantas y de los frutos fue mayor con el uso de la cepa no tóxigena. Y en donde no se inoculó la cepa *A. flavus* UNIGRAS-3 fue menor el peso fresco y seco de las plantas y de los frutos.
6. Por lo que queda demostrado que la cepa de *A. flavus* UNIGRAS-3 no tóxigena pueda competir con cepas tóxicas y por lo tanto disminuir los niveles de aflatoxinas en los frutos. Se concluye que *A. flavus* UNIGRAS-3 puede ser utilizada como biocontrol en la aplicación del cultivo de cacahuete.

## VIII. PERSPECTIVAS

---

1. En relación a las conclusiones y a los resultados obtenidos se demuestra, si se sigue realizando constantemente las aplicaciones del biocontrol, la contaminación por aflatoxinas reducirá, ya que como se ha comprobado que conforme las dosis vayan aumentando el riesgo de que se eleven los niveles de aflatoxinas en este caso en el cultivo de cacahuate sea mínimo.
2. Se ha reportado altas producciones de aflatoxinas en el cultivo de algodón, por lo que una de las recomendaciones para futuros trabajos de investigación, es realizar pruebas en este cultivo y comprobar si se puede aplicar un biocontrol para la contaminación de aflatoxinas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abbas, H. (2005). *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton: Ed. CRC Press/Taylor & Francis, 587 p.
2. Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol.17, pp. S79-S84.
3. Accinelli, C., Abbas, H., Vicari, A., y Shier, W. (September 2014). Aflatoxin contamination of corn under different agro-environmental conditions and biocontrol applications. *Crop Protection*, Vol.63, pp. 9-14.
4. Akande, K.E., Abubakar, M. M., Adegbola, T.A., y Bogoro, S.E. (2006). Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol.5, Núm. 5: pp. 398-403.
5. Ali, S., Ahmad, A., Setapar, S., Zakaria, Z., Talib, Khamis, A., y Hoque, M. (October 2014). The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: A review. *Journal of Microbiology*, Vol.52, Núm. 10: pp. 807-818.
6. Amaike, S., y Keller, N. (September 2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, Vol.49, pp. 107-133.
7. Arrúa, A., Moreno, E., Quezada, M., Moreno, J., Vázquez, M. & Flores, A. (2012). *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol.3, Núm. 4: pp. 1047-1052.
8. Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R. y Holley, R.A. (2005). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brasil nuts. *Journal Stored Products Research*, 41 (5): pp. 513-527.
9. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods Of Analisis (A.O.A.C). (1995). Twelfth Edition, William Horwits Editor, Washigton, D. C. Chapter 26, Natural Poisons. Alfatoxins, Method I (CB) parts 26.016, 26.003, 26.017, 16.018 (a).
10. Badui, S. (1999). *Química de los alimentos*. Ed. Longman de México Editores. S. A. de C.V., 639 p.
11. Baker, K., y Cook, R. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco: Freeman, pág. 433.

12. Barrera, J. (2006). *La Vedralia, Rodolia cardinalis: 120 años después*. *Vedralia* 13 (1): 1-2.
13. Bhatnagar, D., Cleveland, T. y Cotty, P.J. (1992). Mycological Aspects of Aflatoxin Formation. pp. 327-345. *Agricultural and Veterinary Problems*.
14. Brown, R., Cotty, P., y Cleveland, T. (August 1991). Reduction in Aflatoxin Content of Maize by Atoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, Vol.54, Núm. 8: pp. 623-626.
15. Carrillo, L. (2003). Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>
16. Celiker, H., Mallikarjunan, P., Schmale III, D., y Christie, M. (October 2014). Discrimination of moldy peanuts with reference to aflatoxin using FTIR-ATR system. *Food Control*, Vol.44, pp. 64-71.
17. Celiker, H., Mallikarjunan, P., y Kaaya, A. (April 2015). Characterization of Invasion of Genus *Aspergillus* on Peanut Seeds Using FTIR-PAS. *Food Analytical Methods*.
18. Chauhan, Y., Tatnel, J., Krosch, S., Karanja, J., Gnonlonfin, B., Wanjuki, I., Wainaina, J., y Harvey, J. (July 2015). An improved simulation model to predict pre-harvest aflatoxin risk in maize. *Field Crops Research*, Vol.178, pp. 91-99.
19. Christensen, C., y Kaufmann, H. (1976). *Contaminación por hongos en granos almacenados*. México: Ed. Pax, 199 pág.
20. Chu, F., y Ueno, I. (1977). *Production of antibody against aflatoxin B<sub>1</sub>*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: pp. 1125-1128.
21. Craufurd, P. Q., Prasad, P. V., Waliyar, F., y Taheri, A. (July 2006). Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. *Field Crops Research*, Vol.98, Núm. 1: pp. 20-29.
22. Cook, R., y Baker, K. (1983) *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St. Paul, MN, EEUU. *American Phytopathological Society Press*. 539 pág.
23. Cotty, P. J. (1994). Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology*, 84(11): 1270-1277.

24. Dharmaputra, O. S. *et. al.* (2003). CONTROL OF AFLATOXIGENIC *Aspergillus flavus* IN PEANUTS USING NONAFLATOXIGENIC *A. flavus*, *A. niger* and *Trichoderma harzianum*. *Biotropia*, Núm. 21: pp. 32-44.
25. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 2174/2003 DE LA COMISIÓN de 12 de diciembre de 2003 que modifica el Reglamento (CE) no 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas. L 326/12.
26. Diener, U.L. (1989). Preharvest Aflatoxin Contamination of Peanuts, Corn and Cottonseed: A Review. *Biodeterioration Research* 2. pp. 217-244.
27. Durán, A., López, V., Esqueda, V., Joaquín, T., y Cumpián, J. (2011). *Manual de producción del cultivo de cacahuate *Arachis hypogaea* L. en el estado de Veracruz*. Campo Experimental Cotaxtla. Medellín de Bravo, Veracruz.: Ed. INIFAP.
28. Duran, R. M., Cary, J. W., y Calvo, A. M. (2009). The Role of veA in *Aspergillus flavus* Infection of Peanut, Corn and Cotton. *The Open Mycology Journal*, Vol.3, Núm. 10: pp. 27-36.
29. Eaton, D., & Groopman J. (1994). *The Toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego: Ed. Academic, 544 p.
30. Ehrlich, K. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Front Microbiology*, Vol.5, Núm. 50: pp.1-9.
31. FAO/OMS. (1996). Informe de la 28ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos. Manila, 18 - 22 de marzo. FAO. Roma.
32. Food and Drug Administration (FDA). U. S. <http://www.fda.gov/>.
33. Gnanamanickam, S., Vasudevan, P., Reddy, M., Kloepper, J. & Défago, G. (2002). *Principles of Biological Control*. Gnanamanickam, S. Biological control of crop diseases (pp. 1-9). New York: Ed. M. Dekker, 468 p.
34. Groopman, J., Kensler, T., y Wild, C. (April 2008). Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries. *Annual Review of Public Health*, Vol.29, pp. 187-203.
35. Guchi, E. (2015). Effect of Storage Time on Occurrence of *Aspergillus* species in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Eastern Ethiopia. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, Vol.3, Núm. 1: pp. 1-5.

36. Gómez, J. (1951). Clave determinativa de las especies del género *Aspergillus*. Ed. Universidad de Murcia. pp. 25-85.
37. Horn, B. (2005). Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*. Vol.97, Núm. 1: pp. 202-217.
38. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (2005). *Guía para cultivar cacahuete de temporal en la cuenca del alto balsas*. Colegio de Postgraduados. Universidad Autónoma de Chapingo. Universidad Autónoma de Guerrero. [http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo\\_sectorial/Guerrero/30guerrero.pdf](http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Guerrero/30guerrero.pdf)
39. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (2002). *Producción del cultivo de cacahuete en el estado Morelos*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental “Zacatepec”. Zacatepec, Morelos, Méx. [http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo\\_sectorial/Guerrero/30guerrero.pdf](http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Guerrero/30guerrero.pdf)
40. International Seed Testing Association (ISTA) (2009). Handbook on Seedling Evaluation. Bassersdorf, Switzerland: Ed. International Seed Testing Association, 3er. edition.
41. Jacas, J., Caballero, P., y Avilla, J. (2010). *El control biológico de plagas y enfermedades: la sostenibilidad de la agricultura mediterránea*. Castelló de la Plana: Ed. Universitat Jaume I, Servei de Comunicació i Publicacions, 224 p.
42. Klich, M, A., Samson R, A. (1996). *Aspergillus* reference cultures. International Union of Microbiological Societies.
43. Klich, M. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht, The Netherlands: Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 116 p.
44. Klich, M. (2009). *Health effects of Aspergillus in food and air*. *Toxicol ind health*. 9(25): pp. 657-667.
45. Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X., y Yu, F. (30 April 2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.139, Núm. 1-2: pp. 31-35.
46. Lamb, M. C., y Sternitzke D.A. (July 2001). Cost of Aflatoxin to the Farmer, Buying Point, and Sheller Segments of the Southeast United States Peanut Industry. *Peanut Science*, Vol.28, Núm. 2: pp. 59-63.

47. Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R., y Visconti, A. (2005). MYCOTOXINS (detection methods, management, public health and agricultural trade).
48. Abacarca, L. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S63-S68.
49. Luo, M., Liang, X., Dang, P., Holbrook, C., Bausher, M., Lee, R., y Guo, B. (2005). Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Science*. 169:695-703.
50. Lynch, R., y Wilson, D. (July 1991). Enhanced Infection of Peanut, *Arachis hypogaea* L., Seeds With *Aspergillus flavus* Group Fungi Due to External Scarification of Peanut Pods by the Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller). *Peanut Science*, Vol.18, Núm. 2: pp. 110-116.
51. Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C., y Vázquez, G. (2013). EL Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol.31, Núm. 2: pp. 126-146.
52. Mehan, V., McDonald, D., y Rajagopalan, K. (January 1987). Resistance of Peanut Genotypes to Seed Infection by *Aspergillus Flavus* in Field Trials in India. *Peanut Science*, Vol.14, Núm. 1: pp. 17-21.
53. Mehl, H., Jaime, R., Callicott, K., Probst, C., Garber, N., Ortega, A., Grubisha, L., y Cotty, P. (December 2012). *Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol.1273, Núm. Advances Against Aspergillosis II, pp. 7-17.
54. Mellon, J., Dowd, M., y Cotty, P. (2002). Time Course Study of Substrate Utilization by *Aspergillus flavus* in Medium Simulating Corn (*Zea mays*) Kernels. *J. Agric. Food Chem.*, Vol.50, Núm. 3: pp.648-652.
55. Méndez, J. A., Arámbula, G., Loarca, M. G., González, J., Castaño, E., y Moreno, E. (2004). Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *Journal of Stored Products Research*, 40 (1): pp. 87-94.
56. Molina, M., y Giannizzi. (December 1999). Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Food Research International*, Vol.32, Núm.10: pp. 677-682.

57. Moreno, E. (1988). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. México: Ed. UNAM, 109 pág.
58. Moreno, E., y Gil, M. (1991). *La biología de Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas*. México: Ed. UNAM, 42 p.
59. Nigam, N. y Mukerji, K., G. (1988). *Biological Control - Concepts and Practices*. Mukerji, K., G. y Garg, K., L. Biocontrol of plant diseases. Vol.1 (pp. 1-11). Boca Raton, Florida: Ed. CRC Press.
60. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud. [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/)
61. Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Facultad de química. UNAM. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/NOMcereales\\_12434.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/NOMcereales_12434.pdf)
62. Norma Oficial Mexicana NOM-F-353/1-S-1980, Cacahuete, otras nueces, granos y sus productos - Determinación de Aflatoxinas. Colegio de Posgraduados. Banco de normas mexicanas. [www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-353-1-S-1980.PDF](http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-353-1-S-1980.PDF)
63. Oguz, H. (October 2012). Detoxification of aflatoxin in poultry feed: a review from experimental trials. *Lohmann Information*, Vol.47, Núm. 2: pp. 45-56.
64. Olanya, O. M., Hoyos, G. H., Tiffany, L. H., y McGee, D. C. (1997). Waste corn as a point source of inoculum for *Aspergillus flavus* in the corn agroecosystem. *Plant Disease*. Vol.81, No. 6: pp. 576-581.
65. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma. (1982). Perspectiva sobre micotoxinas. Documentos seleccionados de la conferencia mixta fao/oms/pnuma sobre micotoxinas celebrada en nairobi, 19-27 de septiembre de 1977.
66. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2012). *Statistics Division*. [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E)

67. Pattron, D. D. (2006). *Aspergillus*, Health Implication & Recommendations for Public Health Food Safety. *Internet Journal of Food Safety*, Vol.8, pp. 19-23.
68. Cotty, P., J., Bayman, P., Egel, D., S., y Elias, K., S. (1994). Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. K.A. Powell, A. Renwick, J.F. Peberdy (Eds.), *The Genus Aspergillus*, Plenum Press, New York, p. 1.
69. Rajani, P., Sridevi, V., y Chandana Lakshmi, M., V., V. (2012). A Review on Biological Control of Aflatoxin Crop Contamination. *ijCEPr (International Journal of Chemical, Enviromental Pharmaceutical Research)*. Vol. 3, No. 1, 83-86. <http://ijcepr.in/vol-3/issue-1/13.pdf>.
70. Peterson, S. (2000). *Phylogenetic relationships in Aspergillus based upon rDNA sequence analysis*. In: Samson RA, Pitt JI, Eds. *Classification of Penicillium and Aspergillus: integration of modern taxonomic methods*. Reading, UK: Harwood Publishers. pp. 323-356.
71. Pildain, M. B., Cabral, D., y Vaamonde, G. (Diciembre 2005). Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la argentina, caracterización morfológica y toxigénica. *RIA. REVISTA DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS*, Vol.34, Núm. 34: pp. 3-19.
72. Pildain, M. B., Vaamonde, G., y Cabral, D. (15 de May 2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.93, Núm. 1: pp. 31-40.
73. Pitt, J., y Hocking, A. (2009). *Fungi and food spoilage*. New York: Ed. Springer, 519 p.
74. Pitt, J., Samson, R., y Frisvad, J. (2000). List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: Samson R.A., Pitt J.I., editors. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers; Amsterdam: pp. 9-79.
75. Pfenning L. H., y Magalhães, de A. L. (2011). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas Manual de biología de suelos tropicales. Moreira, F., Huising, E. J., & Bignell, D. (Eds.), *Manual de biología de suelos tropicales*. (pp. 243-280). México.
76. Plascencia, J. (2004). Aflatoxins in Maize: A Mexican Perspective. *Journal of Toxicology, TOXIN REVIEWS*, Vol.23, Núm. 2-3: pp. 155-177.

77. Podile, A. y Kishore, G. (2002). *Biological Control of Peanut Diseases*. Gnanamanickam, S. Biological control of crop diseases (pp. 131-160). New York: Ed. M. Dekker.
78. Rajani, P., Sridevi, V., & Chandana, M. (2012). A Review on Biological Control of Aflatoxin Crop Contamination. *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research*, Vol.3, Núm. 1: pp. 83-86.
79. Rai, M., y Varma, A. (2010). *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. Belin: Ed. Springer, 405 p.
80. Rajasekaran, K., Cary, J., Cotty, P., y Cleveland, T. (2008). Development of a GPE-expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. *Mycopathologia*, Vol.165, Núm. 2: pp. 89-97.
81. Raper, K., y Fennell D. (1965). *The genus aspergillus*. Baltimore : Williams y Wilkins. 686 p.
82. Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz .MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02 7p.
83. Robert E. Lynch y David M. Wilson. (1991). Enhanced Infection of Peanut, *Arachis hypogaea* L., Seeds With *Aspergillus flavus* Group Fungi Due to External Scarification of Peanut Pods by the Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller)<sup>1</sup>. Peanut Science: July 1991, Vol. 18, No. 2, pp. 110-116.
84. Robles, R. (1990). Producción de granos y forrajes. Ed. Limusa, México: 663 p.
85. Robles, R. (1980). Producción de Oleaginosas y Textiles. Ed. Limusa, México: 675 p.
86. Rodríguez, L., Arredondo, H., Williams, T., y Barrera, J. (2015). *Pasado, presente y perspectivas del control biológico en México*. En Casos de control biológico en México, vol. 2 (pp. 17-28). Texcoco, Estado de México. Ed. Fundación de Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas: Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias; Chapingo, Estado de México.
87. Samson, R., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J., y Varga, J. (2007). *Diagnostic tools to identify black Aspergilli*. *Studies in Mycology* 59: pp. 129–146.
88. Sánchez, D., S. (1992). Taxonomía, origen y dispersión del cacahuete: *Arachis hypogaea* L. México: Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Difusión Cultural. pp. 26.

89. Serrano, L. y Galindo, E. (2007). *Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario*. Ciencia 58: pp. 77-88.
90. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2014). Base de datos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/siembras-y cosechas/>
91. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2014). Base de datos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/cacahuate/>
92. Sinha, K., y Bhatnagar D. (1998). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. New York: Ed. M. Dekker.
93. Speijers, G.J.A., y Speijers, M.H.M. (October 2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, Vol.153, Núm. 1: pp. 91-98.
94. USDA, Agricultural Research Service. (2008). *Managing Aflatoxins in Arizona*. Arizona cotton research and protection council. Tucson, Arizona. <http://cals.arizona.edu/research/cottylab/azaflatox.htm>.
95. Tadeo, M., Espinosa, A. y Bayardo, M. (2009). Manual de prácticas. Laboratorio de producción de granos y oleaginosas. Departamento de Ciencias Agrícolas. FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, México. UNAM: 80 p.
96. Trucksess, M. W., y Scott, P. M. (February 2008). Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, Vol.25, Núm. 2: pp. 181-192.
97. Trejo, M. A., y Pascual, S. B. (2010). Evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos. *Taller multidisciplinario de procesos tecnológicos de frutos y hortalizas*.
98. Vicam Technologies. (1999). Aflatest instruction manual. Watertown, U.S.A. p. 96.
99. Villa, M. H., y Pabón, A. G. (1994). Métodos Inmunoquímicos aplicados al análisis de Micotoxinas. *Rev. Fac. Cienc. Univ. Nal. Colomb. Medellín (Colombia)*, 4(2); 105-118.
100. Weidenborner, M. (2013). *Mycotoxins in foodstuffs*. Boston, Massachusetts: Ed. Springer, 739 p.

101. Wilson, D., M. (1988). *Potencial for Biological Control of Aspergillus Flavus and Aflatoxin Contamination*. Mukerji, K., G. & Garg, K., L. Biocontrol of plant diseases. Vol.2 (pp. 55-66). Boca Raton, Florida: Ed. CRC Press.
102. Yin, YN., Yan, LY., Jiang, JH., Ma, ZH. (October 2008). Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, Vol.9, Núm. 10: pp. 787-792.
103. Zavaleta, E., Bravo, L., y Guigón, C. (2015). *Fitopatógenos con origen en el suelo*. En Casos de control biológico en México, vol. 2 (pp. 17-28). Texcoco, Estado de México. Ed. Fundación de Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas: Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias; Chapingo, Estado de México.
104. Zenteno, M. (1971). *Producción de aflatoxinas por cepas de Aspergillus flavus aisladas de maíz*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol*, 13: pp. 263-266.

## ANEXOS

**ANEXO 1.** Registro de características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus*.

Características macroscópicas (Colonias)		
<b>Diámetro</b>		
<b>Tamaño de esclerocios</b>		
<b>Color</b>		
Características microscópicas		
<b>Conidióforo</b>	Longitud $\mu\text{m}$	
	Textura de la superficie	
<b>Vesícula</b>	Diámetro $\mu\text{m}$	
	Forma	
<b>Seriación</b>	Uniseriados/ Biseriados	
<b>Conidios</b>	Longitud $\mu\text{m}$	
	Forma	
	Aspecto de la superficie	

Fuente: Klich, 2002.

**ANEXO 2.** Curva patrón de fenoles totales ácido gálico/g

No. de tubo	Ác. Gálico (mg/mL)	Ác. Gálico ( $\mu\text{L}$ )	Agua Destilada ( $\mu\text{L}$ )	Agua Destilada ( $\mu\text{L}$ )	Folin Ciocalte ( $\mu\text{L}$ )	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	Agitar y dejar reposar	Leer en el espectro
<b>Bco.</b>	0	0	200	1500	100	200	30 min.	765 nm
<b>1</b>	0.02	40	160					
<b>2</b>	0.04	80	120					
<b>3</b>	0.06	120	80					
<b>4</b>	0.08	160	40					
<b>5</b>	1.0	200	0					

\*Solución patrón de ácido gálico 0.1 mg/mL

Pesar 0.010 g y se disuelven en 1 mL de etanol. Se afora con agua destilada a 100 mL.

\* Carbonato de sodio anhidro 20 % p/v

Pesar 20 g de carbonato de sodio anhidro y disolverlo en 80 mL de agua destilada hirviendo. Enfriar a temperatura ambiente, después de 24 horas, filtrar sobre papel y aforar a 100 mL con agua destilada.

\*Reactivo comercial de Folin-Ciocalteu

Fuente: Trejo, 2010.

**ANEXO 3.** Comparación de medias de producción de aflatoxinas en cacahuates *in vitro* con *A. flavus*.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	372,5	4,528	Sí	*	-119.5 a 64.51
T1 vs T3	370,0	4,498	Sí	*	58.99 a 243.0
T1 vs T4	830,0	10,09	Sí	***	-121.7 a 62.31
T2 vs T3	-2,500	0,03039	No	ns	86.47 a 270.5
T2 vs T4	457,5	5,561	Sí	**	-94.19 a 89.79
T3 vs T4	460,0	5,592	Sí	*	-272.7 a -88.67

**ANEXO 4.** Comparación de medias de altura de las plantas de cacahuete inóculadas con *A. flavus* en invernadero.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	1,200	0,7861	No	ns	-4.976 a 7.376
T1 vs T3	1,200	0,7861	No	ns	-4.976 a 7.376
T1 vs T4	0,2000	0,1310	No	ns	-5.976 a 6.376
T2 vs T3	0,0000	0,0000	No	ns	-6.176 a 6.176
T2 vs T4	-1,000	0,6551	No	ns	-7.176 a 5.176
T3 vs T4	-1,000	0,6551	No	ns	-7.176 a 5.176

**ANEXO 5.** Comparación de medias de peso fresco de las plantas de cacahuete inóculadas con *A. flavus* en invernadero.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	-27,48	1,209	No	ns	-119.5 a 64.51
T1 vs T3	151,0	6,640	Sí	**	58.99 a 243.0
T1 vs T4	-29,68	1,305	No	ns	-121.7 a 62.31
T2 vs T3	178,5	7,849	Sí	***	86.47 a 270.5
T2 vs T4	-2,200	0,09676	No	ns	-94.19 a 89.79
T3 vs T4	-180,7	7,946	Sí	***	-272.7 a -88.67

**ANEXO 6.** Comparación de medias de peso fresco de los frutos de cacahuete producidos en plantas inóculadas con *A. flavus* en invernadero.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	-15,98	2,574	No	ns	-41.09 a 9.138
T1 vs T3	10,59	1,706	No	ns	-14.53 a 35.71
T1 vs T4	-10,84	1,747	No	ns	-35.96 a 14.27
T2 vs T3	26,57	4,280	Sí	*	1.452 a 51.68
T2 vs T4	5,136	0,8274	No	ns	-19.98 a 30.25
T3 vs T4	-21,43	3,453	No	ns	-46.55 a 3.684

**ANEXO 7.** Comparación de medias de peso seco de las plantas de cacahuete inóculadas con *A. flavus* en invernadero.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	-2,880	0,2924	No	ns	-42.74 a 36.98
T1 vs T3	75,78	7,693	Yes	***	35.92 a 115.6
T1 vs T4	-5,000	0,5076	No	ns	-44.86 a 34.86
T2 vs T3	78,66	7,985	Yes	***	38.80 a 118.5
T2 vs T4	-2,120	0,2152	No	ns	-41.98 a 37.74
T3 vs T4	-80,78	8,200	Yes	***	-120.6 a -40.92

**ANEXO 8.** Comparación de medias de peso seco de frutos de cacahuete producidos en plantas inóculadas con *A. flavus* en invernadero.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	-1,986	0,6388	No	ns	-14.56 a 10.59
T1 vs T3	4,504	1,449	No	ns	-8.074 a 17.08
T1 vs T4	-2,212	0,7115	No	ns	-14.79 a 10.37
T2 vs T3	6,490	2,088	No	ns	-6.088 a 19.07
T2 vs T4	-0,2260	0,07270	No	ns	-12.80 a 12.35
T3 vs T4	-6,716	2,160	No	ns	-19.29 a 5.862

**ANEXO 9.** Comparación de medias producción de aflatoxinas totales en cacahuates de plantas inóculadas en invernadero con *A. flavus*.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	14,00	7,074	Sí	**	5.037 a 22.96
T1 vs T3	6,000	3,032	No	ns	-2.963 a 14.96
T1 vs T4	11,00	5,558	Sí	*	2.037 a 19.96
T2 vs T3	-8,000	4,042	No	ns	-16.96 a 0.9631
T2 vs T4	-3,000	1,516	No	ns	-11.96 a 5.963
T3 vs T4	5,000	2,526	No	ns	-3.963 a 13.96

**ANEXO 10.** Comparación de medias producción de aflatoxinas totales en cacahuates de plantas inóculadas en invernadero con *A. flavus*.

Prueba de Tukey	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	95% CI of diff
T1 vs T2	0,2000	7,746	Sí	**	0.08306 a 0.3169
T1 vs T3	0,2500	9,682	Sí	***	0.1331 a 0.3669
T1 vs T4	0,1767	6,842	Sí	**	0.05973 a 0.2936
T2 vs T3	0,05000	1,936	No	ns	-0.06694 a 0.1669
T2 vs T4	-0,02333	0,9037	No	ns	-0.1403 a 0.09360
T3 vs T4	-0,07333	2,840	No	ns	-0.1903 a 0.04360