



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

**El *status* nutrimental del suelo y su influencia en la contaminación por
aflatoxinas en el cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.)**

Tesis que presenta

IBTA. María Magdalena Cervantes Juan

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Director de Tesis: Dr. Juan José Peña Cabriales

Co Directora de Tesis: Dra. Dora Linda Asunción Guzmán de Peña

Irapuato, Guanajuato.

Mayo de 2016.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y en el Laboratorio de Micotoxinas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Juan José Peña Cabriales y de la Dra. Dora Linda Asunción Guzmán de Peña.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada.

A CINVESTAV por haberme aceptado en el programa de Maestría en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas.

A mis padres Israel Cervantes y Anita Juan por sus consejos y formación, en especial a mi madre por su apoyo incondicional para poder cumplir con mis metas profesionales y a mi hermano Ismael Cervantes por sus acertados consejos y su ejemplo para seguir adelante.

Al Dr. Juan José Peña Cabriales por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por su apoyo profesional, sus enseñanzas y sabios consejos.

A la Dra. Dora Linda Guzmán de Peña por compartir sus conocimientos, así como contribuir a mi crecimiento profesional y personal con sus valiosos consejos.

A mis asesores Dr. John Délano, Dra. Mercedes López y Dr. Rafael Montiel por sus contribuciones en el desarrollo del presente trabajo y su apoyo para mejorar la redacción de este manuscrito.

Al M.C. Antonio Vera Núñez, por su amistad, consejos, aportaciones en el trabajo experimental y por ayudarme a mejorar la redacción de esta tesis.

A la Dra. Areli Cruz Hernández, Dr. Milton Barcos Arias por su amistad, enseñanzas y por sus contribuciones de manera académica y personal.

A la TSU. Anahí Torres por su apoyo en el presente trabajo y su disposición para aprender de manera conjunta.

A Luis Ernesto Hernández, Karina Manzo y Francisco Saldaña por su apoyo, amistad incondicional y por contribuir a mi crecimiento personal.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental: Sergio Hernández, Luis León, David Camarena, Aníbal Silva, Coyolxauhqui Barrera, Abraham García, Conrado Guzmán, Carlos Chávez, Mónica Uribe, Fernando Barajas, Adolfo Flores, Armando Chapa, Adolfo Valerio, Jaime Mendoza, Daniel Martínez y Jonathan Pérez por su compañerismo y apoyo.

A mis compañeras del Laboratorio de Micotoxinas: Laura Hernández, Laura Valdés, Diana Vicencio, Guadalupe Gómez, Viviana Sandoval y Estefanía Espinoza por su amistad y momentos de convivencia.

A Belén Rodríguez, Agustina Rosas, Azucena Cabrera, Liz Lazcano y Sara Miguel por su amistad y apoyo en esta etapa de mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades del cultivo de cacahuete	1
1.2 Características nutricionales del grano de cacahuete	1
1.3 Producción mundial y nacional de cacahuete.....	2
1.4 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo	3
1.5 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	4
1.6 Simbiosis leguminosas- <i>Rhizobia</i>	4
1.7 Formación de la simbiosis	5
1.8 Tipos de nódulos: determinados e indeterminados	6
1.9 Asociación <i>Rhizobium</i> -hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en leguminosas.....	8
1.10 El <i>status</i> nutrimental del suelo	8
1.11 Efecto de la fertilización química sobre el rendimiento en el cultivo de cacahuete	9
1.12 Efecto de la fertilización química sobre las poblaciones microbianas.....	9
1.13 Patrones de diversidad fúngica: frecuencia relativa.....	10
1.14 Contaminación de cacahuete por hongos en campo y durante el almacenamiento	11
1.15 Características de los hongos pertenecientes a la sección <i>Aspergillus flavi</i>	11
1.16 Aflatoxinas	12
1.17 Contaminación por aflatoxinas en cacahuete	13
1.18 Asociación entre contaminación por aflatoxinas y la fijación biológica de nitrógeno.....	13
II. JUSTIFICACIÓN.....	14
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos	15

V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1 Medios de cultivo	16
5.2 Material biológico.....	17
5.2.1 Cacahuete criollo de Tehuiztingo, Puebla	17
5.2.2 Cepas microbianas.....	17
5.3 Sitio de estudio	18
5.4 Muestreo de suelo en el cultivo de cacahuete criollo.....	18
5.5 Muestreo de plantas de cacahuete y selección de nódulos.....	18
5.6 Caracterización físico-química del suelo de Tehuiztingo, Puebla	18
5.7 Aislamiento de <i>Rhizobium</i> en nódulos de cacahuete criollo de Tehuiztingo	19
5.7.1 Aislamiento primario.....	19
5.7.2 Aislamiento secundario	19
5.8 Caracterización de <i>Rhizobium</i> en nódulos de cacahuete criollo de Tehuiztingo	19
5.8.1 Caracterización microscópica: Tinción Gram	19
5.8.2 Pruebas bioquímicas.....	20
5.8.3 Evaluación de la producción de metabolitos de promoción de crecimiento vegetal por los aislados bacterianos	21
5.9 Determinación de la capacidad de los aislados bacterianos para fijar nitrógeno	22
6.0 Determinación la presencia de hongos aflatoxigénicos en suelo y en granos de cacahuete, así como el nivel de aflatoxinas en grano por HPLC.....	22
6.0.1 Determinación de la frecuencia relativa del grupo <i>Aspergillus flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies en el cultivo de cacahuete criollo.....	22
6.0.2 Identificación macro y microscópica de los aislados fúngicos del grupo <i>A. flavi</i>	24
6.0.3 Determinación de aflatoxinas en granos de cacahuete almacenados a diferentes tiempos en sacos y a granel.....	24
6.0.4 Determinación de la capacidad micotoxigénica de los <i>Aspergilli</i> aislados de granos de cacahuete por un método presuntivo	28
6.0.5 Cuantificación de aflatoxinas en los extractos provenientes de los aislados presuntamente positivos para síntesis de AFB ₁	28
6.1 Ensayos en invernadero	29

6.1.1 Ensayos de nodulación bajo condiciones de invernadero.....	29
6.1.2 Ensayo de invernadero para comparar el efecto de la fertilización química (con N y P) vs. biológica (con <i>Rhizobium</i> -hongos micorrícicos arbusculares) sobre la población de hongos aflatoxigénicos en la rizósfera y en la contaminación por aflatoxinas en el cultivo de cacahuate.....	30
6.2 Análisis estadístico	34
VI. RESULTADOS.....	35
6.1 Caracterización físico-química del suelo utilizado en el cultivo de cacahuate en Tehuiztzingo, Puebla	35
6.2 Aislamiento de <i>Rhizobium</i> de nódulos de cacahuate criollo	35
6.3 Caracterización de <i>Rhizobium</i> de nódulos de cacahuate criollo.....	36
6.3.1 Resistencia/Susceptibilidad a antibióticos (Antibiogramas).....	36
6.3.2 Evaluación de la producción de metabolitos asociados a la promoción de crecimiento vegetal en los aislados bacterianos	37
6.4 Determinación de la capacidad de los aislados bacterianos para fijar nitrógeno	38
6.5 Determinación la presencia de hongos aflatoxigénicos en suelo y en granos de cacahuate, así como el nivel de aflatoxinas en grano por HPLC.....	38
6.5.1 Determinación de la frecuencia relativa del grupo <i>Aspergillus flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies en el cultivo de cacahuate criollo.....	38
6.5.2 Identificación macro y microscópica de los aislados fúngicos pertenecientes al grupo <i>A. flavus</i>	42
6.5.3 Determinación del nivel de aflatoxinas en granos de cacahuate almacenados en sacos y a granel.....	43
6.5.4 Determinación de la capacidad micotoxigénica de los hongos de la sección <i>A. flavi</i> por el método presuntivo	45
6.5.5 Producción de aflatoxinas de <i>A. arachidicola</i> aislado de cacahuate criollo	47
6.6 Ensayos en invernadero	48
6.6.1 Ensayos de nodulación bajo condiciones de invernadero.....	48
6.6.2 Efecto de la fertilización química (con N y P) vs. biológica (con <i>Rhizobium</i> -hongos micorrícicos arbusculares) sobre la población de hongos aflatoxigénicos en la rizósfera y en la contaminación por aflatoxinas en el cultivo de cacahuate.....	49
VII. DISCUSIÓN.....	58

VIII. CONCLUSIONES.....	65
IX. PERSPECTIVAS.....	66
X. BIBLIOGRAFÍA.....	67
XI. APÉNDICE	74
1) Curva de calibración de ácido indolacético en medio ELMA	74
2) Descripción macro y microscópica de los aislados fúngicos pertenecientes al grupo <i>A. flavus</i> obtenidos de granos de cacahuate	75
3) Curva de calibración de AFB ₁	80
4) Microbiota fúngica con características pertenecientes a la sección <i>A. flavi</i> en suelo de cultivo 45 d después de la siembra de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero.....	81
5) Microbiota fúngica con características pertenecientes a la sección <i>A. flavi</i> en suelo de cultivo 90 d después de la siembra de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de desarrollo de nódulos de leguminosas de tipo indeterminado (izquierda) y determinado (derecha).....	7
Figura 2. Caja Petri con medio malta sal agar con 10 mitades de granos de cacahuate criollo.	24
Figura 3. Nódulos de cacahuate criollo de Tehuitzingo, Puebla.	35
Figura 4. Colonias bacterianas aisladas de nódulos de cacahuate.	36
Figura 5. Resultado positivo de producción de sideróforos en aislado Th3 (a) y de solubilización de fosfatos en el aislado Th4 (b).	37
Figura 6. Población fúngica en el suelo de cultivo de cacahuate criollo.	39
Figura 7. Población fúngica en cáscara de cacahuate criollo.	40
Figura 8. Población fúngica presente en granos de cacahuate criollo.....	42
Figura 9. Cromatograma de capa fina de los extractos de muestras de cacahuate criollo obtenidos por el método 1.....	44
Figura 10. Cromatograma de capa fina de los extractos obtenidos de muestras de cacahuate criollo almacenado 11 meses en sacos por el método 3.....	45
Figura 11. Capacidad micotoxigénica de los aislados evaluada por el método presuntivo en Medio de Coco Agar.....	46
Figura 12. Cromatograma de capa fina de extractos obtenidos de los cultivos de <i>A. parasiticus</i> y <i>A. arachidicola</i> en medio de coco agar.....	47
Figura 13. Respuesta a la inoculación con aislados bacterianos obtenidos de nódulos de cacahuate criollo de Tehuitzingo en plantas de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero.....	49
Figura 14. a) <i>Aspergillus arachidicola</i> aislado de suelo de Tehuitzingo en condiciones naturales, y b) <i>Aspergillus</i> sp. aislado de suelo de Tehuitzingo inoculado con <i>A. parasiticus</i> en invernadero.	51
Figura 15. <i>Aspergillus flavus</i> aislado de suelo de Tehuitzingo fertilizado químicamente.....	53
Figura 16. Floración de las plantas de cacahuate criollo 45 días después de la siembra.....	54

Figura 17. Aspecto de las plantas de cacahuate criollo a los 120 días después de la siembra..... 55

Figura 18. Colonización del consorcio micorrícico en raíces de cacahuate criollo. 57

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Biomasa seca aérea y radicular en plantas de cacahuete inoculadas con <i>Rhizobia</i> nativos obtenidos de nódulos de cacahuete criollo en suelo de cultivo de cacahuete de Copalillo, Guanajuato (ensayo 1).....	49
Gráfica 2. Biomasa seca aérea y radicular en plantas de cacahuete criollo del ensayo (FQ vs. FB) de fertilización química vs. Fertilización biológica (160 dds) cultivadas en suelo de cultivo de cacahuete criollo bajo condiciones de invernadero.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del grano de cacahuate	1
Tabla 2. Principales países productores de cacahuate en el mundo	2
Tabla 3. Principales estados productores de cacahuate en México	2
Tabla 4. Principales municipios productores de cacahuate en el estado de Puebla	3
Tabla 5. Medios y condiciones de cultivo.....	16
Tabla 6. Nodulación de cacahuate criollo	35
Tabla 7. Resistencia o susceptibilidad a antibióticos por los aislados bacterianos	37
Tabla 8. Producción de ácido indolacético (AIA) de los aislados bacterianos (Th1 a Th7) obtenidos de nódulos de cacahuate criollo	38
Tabla 9. Población fúngica de la sección <i>A. flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies aisladas del suelo de cultivo de cacahuate criollo	39
Tabla 10. Población fúngica de la sección <i>Aspergillus flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies en cáscara de cacahuate criollo recién cosechado y almacenado en diferentes condiciones y tiempos	40
Tabla 11. Frecuencia (%) de hongos de la sección <i>Aspergillus flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies en cacahuate criollo en diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento	42
Tabla 12. Identificación microscópica de los aislados fúngicos de la sección <i>A. flavi</i> de granos de cacahuate criollo en diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento	43
Tabla 13. Nivel de AFB ₁ en cacahuate criollo almacenado en sacos y a granel...	45
Tabla 14. Capacidad micotoxigénica de los hongos de la sección <i>A. flavi</i> por el método presuntivo	46
Tabla 15. AFB ₁ producida por <i>A. arachidicola</i> en medio de coco agar	47
Tabla 16. Capacidad de nodulación de los aislados bacterianos obtenidos de nódulos de raíz de cacahuate criollo y actividad nitrogenasa en raíces de plantas de cacahuate cultivadas en arena estéril	48
Tabla 17. Población bacteriana en suelos inoculados con <i>Rhizobium</i> y fertilizados químicamente a los 90 días de siembra de plantas de cacahuate	50

Tabla 18. Población fúngica de la sección <i>A. flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies en suelo bajo diferentes tratamientos en invernadero a los 45 días después de la siembra de plantas de cacahuete	51
Tabla 19. Población fúngica de la sección <i>A. flavi</i> , <i>A. nigri</i> y otras especies en suelo bajo 7 tratamientos en invernadero, a los 90 días después de la siembra de cacahuete.....	52
Tabla 20. Efecto de la fertilización química vs fertilización biológica en el número de nódulos totales y efectivos, y en la actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de cacahuete.....	54
Tabla 21. Absorción de fósforo en plantas de cacahuete criollo bajo condiciones de invernadero y cultivadas en suelo de Tehuiztzingo con diferentes tratamientos.....	56
Tabla 22. Producción de granos de cacahuete por tratamiento en ensayo de invernadero: fertilización química (FQ) vs. fertilización biológica (FB)	56
Tabla 23. Nivel de AFB ₁ en granos de cacahuete del ensayo de invernadero FQ vs FB.....	57

RESUMEN

El cacahuate es importante en la alimentación humana. Una de las principales regiones productoras de cacahuate en México, es la Cuenca del Alto Balsas, donde se ubica Tehuitzingo, Puebla, sitio de estudio de este trabajo. El cacahuate es una leguminosa asociada a bacterias del género *Rhizobium*, lo cual le permite fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, este cultivo está expuesto a la contaminación por hongos aflatoxigénicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la fertilización química (con nitrógeno [N] y fósforo [P]) vs. la fertilización biológica (con *Rhizobium* y hongos micorrícicos arbusculares) sobre la respuesta del cacahuate a los hongos aflatoxigénicos en suelo de Tehuitzingo, Puebla. Para ello se aislaron bacterias a partir de nódulos de cacahuate criollo del sitio de estudio, y se realizó una caracterización morfológica, microscópica y bioquímica. Además, se confirmó la capacidad de nodulación y fijación biológica de nitrógeno de los aislados bacterianos en condiciones de invernadero. Asimismo, se aislaron hongos del grupo *Aspergillus flavi* y se determinó la capacidad micotoxigénica (producción de aflatoxinas) mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Entre los aislados bacterianos obtenidos, cuatro de ellos mostraron capacidad de producir ácido indolacético, sideróforos y solubilizar fosfatos. Mediante el ensayo de nodulación bajo condiciones de invernadero, se identificaron dos aislados nodulantes (Th1 y Th5). Este último promovió una mayor producción de biomasa aérea de plantas de cacahuate, además de una mayor nodulación. En cáscara de cacahuate se encontraron hongos de la sección *A. flavi* en muestras almacenadas durante en sacos durante 14 meses. Los principales géneros de hongos presentes en grano fueron *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* y hongos de la sección *A. nigri* y *A. flavi*. Las frecuencias relativas de los grupos variaron de acuerdo al tiempo y las condiciones de almacenamiento. Se identificó un aislado de *A. arachidicola* como productor de aflatoxinas B y G, proveniente de grano de cacahuate almacenado a granel durante 11 meses. Sólo los granos de cacahuate del tratamiento inoculado con *A. parasiticus* y fertilizado químicamente en condiciones de invernadero presentaron contaminación por aflatoxina B₁. Los niveles detectados fueron mayores al nivel máximo permisible que establece la NOM-247-SSA1-2008. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la fertilización biológica del suelo protege al cultivo de cacahuate criollo de la contaminación por aflatoxinas, mientras que la fertilización química la favorece.

ABSTRACT

Peanuts are an important component of the human diet. One of the main peanut-producing regions in México is “Cuenca del Alto Balsas”, where Tehuitzingo, Puebla, the study site, is localized. Peanut is a legume associated with *Rhizobium* bacteria, which allow nitrogen fixation from the atmosphere. However, this crop is exposed to contamination by aflatoxigenic fungi. The objective of this study was to evaluate the effect of chemical fertilizers (with nitrogen [N] and phosphorus [P]) vs. biological fertilization (with *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi) on the response of peanut to aflatoxigenic soil fungi. In order to do so, bacteria were isolated from nodules of wild peanut grown in Tehuitzingo, Puebla, which were characterized morphologically, microscopically and biochemically. Their ability to nodulate and permit biological nitrogen fixation under greenhouse conditions was also examined. In addition, fungi of the *Aspergillus flavi* group were isolated and their micotoxigenic capacity determined (as aflatoxin production) by thin layer and high-performance liquid chromatography, respectively.

Four bacterial isolates were able to produce indoleacetic acid and siderophores and had phosphate solubilizing activity. Two nodulating isolates (Th1 and Th5), were identified under greenhouse conditions, one of which (Th5) promoted higher biomass production of peanut plants, and increased nodulation. Fungi of the *Aspergillus flavi* section were detected in peanut shells obtained from peanut grain samples stored in bags for 14 months. The main fungi genera present in grains were *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* and members of *A. nigri* and *A. flavi* section. The relative frequencies of the latter varied according to storage time and conditions. An *A. arachidicola* isolate identified as an aflatoxin B and G producer, was obtained from peanut grain stored in bulk for 11 months. Only the peanut grains obtained from plants of inoculated with *A. parasiticus* and chemically fertilized showed B₁ aflatoxin contamination at levels that were higher than the maximum permissible level established by the NOM-247-SSA1-2008 norm. The results obtained in this study suggest that the biological soil fertilization reduces aflatoxin contamination in peanuts, while chemical fertilization stimulates it.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del cultivo de cacahuete

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) es una planta cuyo probable origen se remonta a hace 4000 años en las regiones cálidas de América del sur (i.e., Paraguay, Uruguay, Brasil, Argentina y Perú) y se cree que desde ahí se propagó a regiones tropicales y subtropicales del mundo (Barrera *et al.*, 2002). Este cultivo pertenece a la familia *Leguminosae* y a la subfamilia *Papilionoideae*. Es una planta anual herbácea, erecta, que alcanza un crecimiento de 20-60 cm de altura. Los tallos son ligeramente filamentosos, con ramificaciones desde la base que desarrolla raíces cuando dichas ramas tocan el suelo. La raíz pivotante penetra hasta una profundidad de 90-120 cm y forma en las capas superficiales del suelo ramificaciones colonizadas por rizobia y micorrizas (Asociación Naturland, 2000).

El período de florescencia inicia a las 3-4 semanas después de la siembra y puede prolongarse hasta más de 2 meses. Las flores son amarillas, ostentosas y sésiles en un principio. Pero una vez autofecundadas, el pedicelo desarrolla un tallo o estaquilla de 3-10 cm de longitud (llamado ginóforo), que gradualmente empuja el ovario dentro del suelo para el desarrollo del fruto (Asociación Naturland, 2000; Corporación Chapingo, 2002).

1.2 Características nutricionales del grano de cacahuete

Este cultivo es de gran importancia nutricional ya que su grano es rico en proteínas, fibra, carbohidratos, vitaminas, sales minerales y ácidos grasos no saturados. De esta forma garantiza un buen aporte de energía y proteínas a sus consumidores (Tabla 1). Es materia prima para la producción de botanas, dulces, aceite vegetal, así como tintas, cosméticos, farmacéuticos y jabones (Barrera *et al.*, 2002; Angulo & Joaquín, 2009).

Tabla 1. Composición del grano de cacahuete

	Agua	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Fibra cruda	Ceniza
%	5.0	26	48.0	16.0	3.0	2.0

Fuentes: Asociación Naturland, 2000; Badawi *et al.* (2011).

1.3 Producción mundial y nacional de cacahuete

El cacahuete se cultiva en climas tropicales y subtropicales de Asia, Australia, África y América, donde destacan por su producción India, China, Nigeria y Estados Unidos (FAOSTAT, 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Principales países productores de cacahuete en el mundo

País	Producción (x 10 ⁶ \$1000 Int)	Superficie Cosechada (x 10 ⁶ ha)	Producción (x 10 ⁶ de t)	Rendimiento (t ha ⁻¹)
China	7.39	4.66	16.86	3.62
India	2.45	5.25	9.47	1.80
Estados Unidos	1.33	0.42	1.89	4.50
Nigeria	1.31	2.36	3.00	1.27

Fuente: FAOSTAT, 2013.

La producción nacional de cacahuete en México de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2014), ascendió a alrededor de 100 mil toneladas, obtenidas a partir de una superficie mayor a 56 mil ha. La mayor superficie sembrada correspondió a condiciones de temporal. En nuestro país destacan como principales productores Sinaloa, Chihuahua, Chiapas, Oaxaca y Puebla (Tabla 3). En Puebla, el municipio de Tehuizingo es uno de los productores de cacahuete (Tabla 4), y corresponde al sitio de muestreo de este estudio. El municipio está ubicado en la región conocida como la Cuenca del Alto Balsas, la cual comprende la Mixteca Baja de Oaxaca (región Huajuapán), el centro-sur de Puebla, el oriente y poniente de Morelos y la región norte de Guerrero. La Cuenca del Alto Balsas es el área ecológica más grande en producción de cacahuete en condiciones de temporal en México (INIFAP, 2005).

Tabla 3. Principales estados productores de cacahuete en México

Estado	Valor de producción (x 10 ³ \$)	Producción (t)	Rendimiento (t/ ha ⁻¹)	Sistema de Producción (%)	
				Temporal	Riego
Sinaloa	249.14	27,639.8	1.40	90.2	9.8
Chihuahua	152.14	17,579.7	2.86	1.4	98.6
Chiapas	126.15	12,015.6	1.83	99.9	0.1
Oaxaca	92.69	10,263.8	1.64	90.4	9.6
Puebla	59.80	8,591.9	1.27	90.7	9.3

Fuente: SIAP, 2014.

Tabla 4. Principales municipios productores de cacahuate en el estado de Puebla

Municipio	Valor de producción (\$)	Producción (t)	Rendimiento (t/ ha⁻¹)
Tlapanalá	11, 691.3	1,251.2	2.08
Acatlán	11,261.3	1,732.5	1.16
Huaquechula	8,435.5	1,652.0	1.22
Guadalupe	6,115.2	940.8	1.18
San Pablo Anicano	2,185.1	343.8	1.15
San Pedro Yeloixtlahuaca	1,677.9	283.7	1.14
Piactla	1,350.0	178.2	0.94
Tehuizingo	1,130.7	150.0	1.00

Fuente: SIAP, 2014.

1.4 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo

Los suelos de textura franco-arenosa son los apropiados para el cultivo de cacahuate; los suelos arcillosos no se recomiendan debido a que dificultan la penetración de los ginóforos. La profundidad del suelo para el adecuado desarrollo de las raíces y de los frutos debe ser de 20 a 50 cm. El suelo debe estar provisto de calcio y de una moderada cantidad de materia orgánica para su desarrollo. El pH óptimo para el cultivo oscila de 6 a 7.5 (Asociación Naturland, 2000; Barrera *et al.*, 2002).

Los climas cálidos son los más favorables para el cultivo, debido a que es una planta predominantemente tropical o subtropical. La temperatura óptima para la germinación es 30-34°C (máx. 45°C, mín. 15°C); para el crecimiento vegetativo es 25-30°C. El poder germinativo, el crecimiento y desarrollo se reducen considerablemente con temperaturas menores a 20°C y se detiene por completo a 14°C (Asociación Naturland, 2000).

La planta de cacahuate requiere de 10 a 13 h luz día⁻¹, lo cual incide en el aumento del contenido de aceite en el grano, por lo que debe evitarse el crecimiento de otras plantas, ya sean malezas o de otras especies vegetales que produzcan sombra al cultivo. Por lo general, la planta de cacahuate, es insensible al fotoperiodo (Barrera *et al.*, 2002).

Con respecto a la necesidad de agua, el cacahuate requiere de una precipitación pluvial de 400-600 mm de lluvia bien distribuida durante su ciclo vegetativo. Durante

la etapa de floración (de 30 a 40 días) se requiere una humedad moderada y de la floración a la maduración inicial (y desarrollo de ginóforos), que ocurre de los 40 a 60 días, se requiere mayor humedad. En la etapa final de maduración, que comprende de 20 a 30 días, la planta necesita muy poca humedad (Barrera *et al.*, 2002).

1.5 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El proceso para reducir N₂ a formas de nitrógeno que la planta es capaz de usar, tales como el amonio (NH₄), es conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Es restringido exclusivamente a procariotes de los dominios *Archaea* y *Bacteria* y mediado por el complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Paul, 2007; Ferguson *et al.*, 2010). En la naturaleza existen dos grupos de microorganismos con capacidad de FBN: de vida libre y simbióticos. El primer grupo incluye bacterias anaerobias estrictas (e.g., *Clostridium*), anaerobios facultativos (e.g., *Klebsiella* y *Citrobacter*) o microaeróbicas (e.g., *Azospirillum* y *Xanthobacter*). También se encuentran bacterias aerobias como *Azotobacter* y cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc*. En el segundo grupo se encuentran el actinomiceto *Frankia*, que establece una relación simbiótica con plantas actinorrhizas, y la asociación entre *rhizobia* y las raíces de leguminosas (Ferguson *et al.*, 2010; González, 2012).

Rhizobium sp., *Bradyrhizobium* sp. y *B. japonicum* forman nódulos cuando se asocian a las raíces de la planta de cacahuate. Además, reducen el N₂ a formas de nitrógeno asimilables por la planta (Bogino *et al.*, 2006).

1.6 Simbiosis leguminosas-*Rhizobia*

La familia *Leguminosae* ha desarrollado una relación simbiótica con bacterias rizosféricas llamadas *rhizobia*, incluyendo los géneros *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. Debido a que el N es un factor limitante clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas, la capacidad de las leguminosas para establecer simbiosis con rizobios fijadores de nitrógeno les provee una ventaja sobre otras especies vegetales (Ferguson *et al.*, 2010). La simbiosis leguminosas-*rhizobia* es la más importante asociación en términos de FBN, representando una entrada de 2 x 10⁸ t N año⁻¹ (Graham & Vance, 2003).

Los *rhizobia* invaden las raíces de leguminosas compatibles, dirigiendo el desarrollo de estructuras especializadas llamadas nódulos, en los que las bacterias se diferencian en bacteroides y reducen N₂ hasta amonio (NH₄). Los *rhizobia* son aerobios, Gram negativos, pertenecen a los subgrupos α y β de las Proteobacterias. Tienen morfología bacilar y son móviles por la presencia de un flagelo polar o subpolar y de dos a seis flagelos peritricos (González, 2012).

1.7 Formación de la simbiosis

El establecimiento de la relación mutualista entre *rhizobia* y leguminosas se lleva a cabo por una serie de etapas de desarrollo (Figura 1), mediadas por una cascada de señales fisiológicas reconocidas por ambos participantes (Paul, 2007).

Etapas 1. La nodulación inicia por la infección de los rizobios en los pelos radiculares (e.g., en trébol y frijol) o más raramente por la entrada en los sitios de la emergencia de raíces laterales (e.g., cacahuate) o a través de la penetración de los primordios radiculares en los tallos de algunas leguminosas como *Sesbania* y *Aeschynomene*. Este proceso comienza con la quimioatracción de los rizobios hacia la raíz, donde las bacterias responden a la excreción de compuestos de las plantas, principalmente flavonoides y betaínas, en los exudados radicuales.

Etapas 2. Los rizobios alcanzan el pelo radicular a través de una estructura conocida como un hilo de infección, o tubo, que es una invaginación de la pared del pelo radicular. El tubo de infección ramifica y penetra dentro del córtex de la raíz, donde las células corticales se dividen y amplían para formar un prenódulo en respuesta de la invasión rizobial.

Etapas 3. El hilo de infección llega cerca de las células corticales divisorias que forman varias ramificaciones laterales, llegando a la pared celular de las células corticales. En el punto de contacto, la pared celular se disuelve y los rizobios (de 10-100 células bacterianas) son liberados dentro de la célula nodular por endocitosis.

Etapa 4. Los rizobios son liberados del hilo de infección dentro de las células corticales y cubiertas por una membrana derivada de la planta llamada membrana peribacteroidal. Éstos permanecen físicamente aislados del citoplasma de la célula huésped. Cada bacteria encerrada por la membrana se conoce como un “simbiosoma”.

Etapa 5. Los rhizobia presentan otros cambios pleomórficos y bioquímicos en el simbiosoma y finalmente comienza la FBN. Una vez desarrollado completamente el nódulo por organogénesis, se genera el sistema vascular, el cual facilita el intercambio de N fijado por los bacteroides por nutrientes provenientes de la planta. También se forma una capa de células para excluir el O₂ del interior del nódulo de la raíz (Paul, 2007; Ferguson *et al.*, 2010; González, 2012).

1.8 Tipos de nódulos: determinados e indeterminados

La apariencia y estructura de los nódulos depende de la especie de planta huésped, de modo que se pueden observar dos tipos de nódulos en las leguminosas (Figura 1): *determinados* e *indeterminados* (Ferguson *et al.*, 2010; González, 2012). Generalmente, los nódulos determinados son de forma esférica, alcanzan un tamaño finito y no poseen meristemas activos, e.g., en los géneros *Phaseolus* (frijol), *Vigna* (judía) y *Glycine* (soya). Otras leguminosas producen nódulos cilíndricos (*indeterminados*), con meristemas activos persistentes, los cuales permiten al nódulo crecer, ampliar y producir nuevas células corticales en respuesta al crecimiento vegetal, e.g., en los géneros *Medicago* (alfalfa), *Trifolium* (trébol), y *Arachis* (cacahuate). En los nódulos indeterminados, los rizobios no bacteroides permanecen en el hilo de infección y ellos infectan nuevas células corticales; de esta manera el meristemo del nódulo continúa dividiéndose (Paul, 2007).

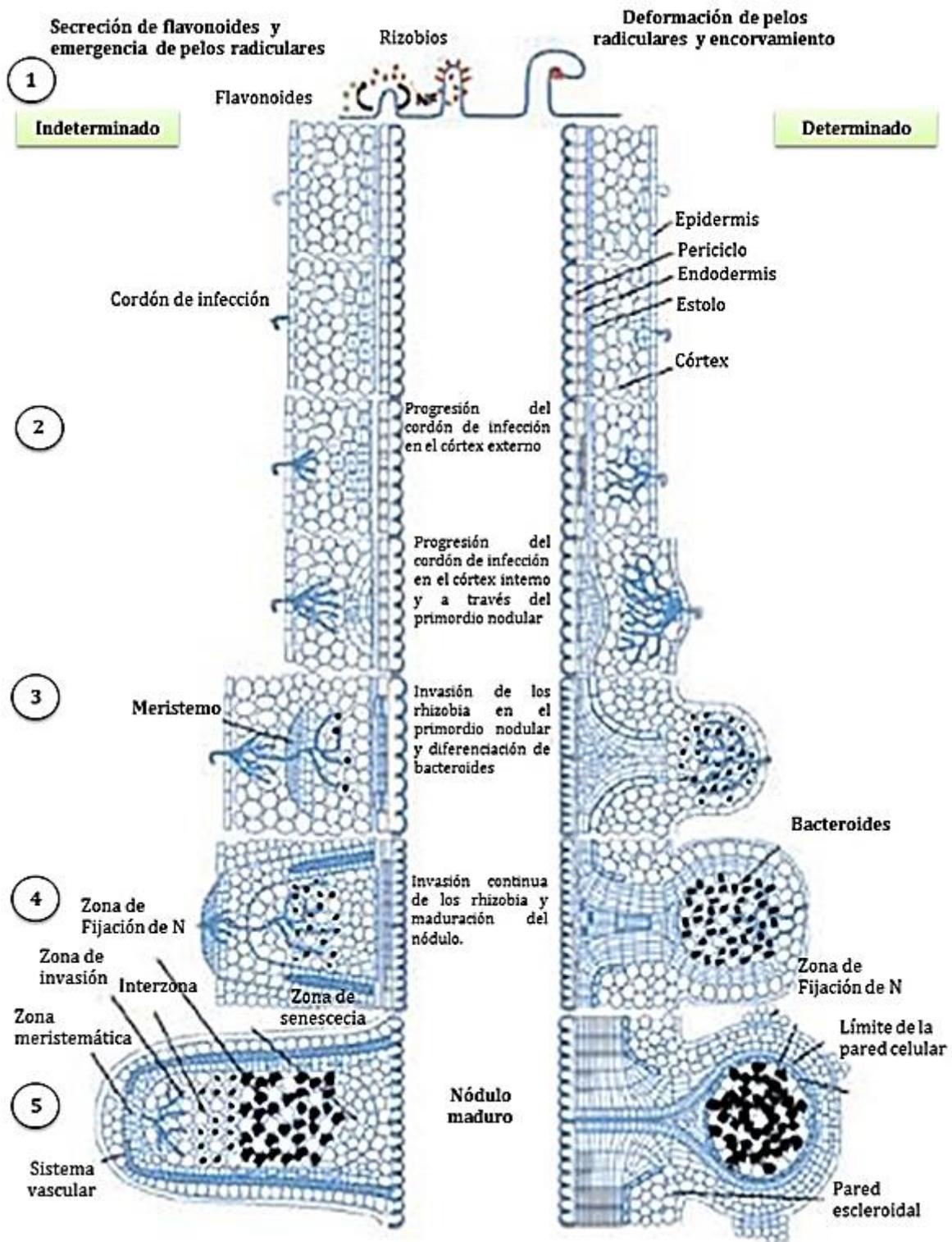


Figura 1. Etapas de desarrollo de nódulos de leguminosas de tipo indeterminado (izquierda) y determinado (derecha) (De acuerdo a Ferguson *et al.*, 2010).

1.9 Asociación *Rhizobium*-hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en leguminosas

Las leguminosas pueden incrementar su capacidad de FBN a través de la simbiosis con hongos micorrícicos, así como la asimilación de nutrientes, principalmente fósforo, que es un factor limitante crítico que participa en la nodulación (Guerra, 2008).

El principal beneficio de la FBN en leguminosas es la mejora en el potencial del rendimiento sin el uso de fertilizantes nitrogenados. El simbiote *Rhizobium* juega un papel de gran importancia al suministrar N para el crecimiento de las leguminosas en suelos deficientes de nutrientes (Zarea *et al.*, 2011). Se ha reportado que la coinoculación con ambos simbiontes tiene una influencia positiva sobre la FBN en leguminosas, resultando en una mayor biomasa vegetal y mejor adquisición de N y P con respecto a las inoculaciones independientes (Azcón *et al.*, 1991).

Los hongos micorrícicos inducen atracción de las poblaciones microbianas rizosféricas debido a los exudados que producen sus hifas. Se ha cuantificado un mayor número de bacterias diazotróficas y simbióticas, además de solubilizadoras de fosfatos que contribuyen al mejoramiento de la nutrición (Ferrera & Alarcón, 2001).

Clua *et al.* (2013), reportaron que la doble inoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y HMA de la especie *Glomus mosseae* en el cultivo de soya en campo, generó un aumento del 40% en los parámetros de crecimiento (altura, grosor de tallo y materia seca de la parte aérea), mayor nodulación y porcentaje de raíces micorrizadas. Este tratamiento causó, además, un aumento significativo del rendimiento.

1.10 El *status* nutrimental del suelo

El suelo es el material mineral y orgánico de origen natural, presente en la superficie de la Tierra que proporciona un entorno para los organismos vivos. Éste se ha formado muy lentamente, por la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento. Está compuesto de

minerales, materia orgánica, diminutos organismos vegetales y animales, aire y agua. Todos estos componentes son importantes por sí mismos, pero lo fundamental es el equilibrio entre ellos. La materia orgánica y los microorganismos aportan y liberan los nutrientes en cantidades y proporciones adecuadas para mantener el *status* nutrimental del suelo creando las condiciones para que las plantas respiren, absorban agua, nutrientes y desarrollen sus raíces (Paul, 2007; FAO, 2015).

Un suelo es fértil cuando tiene los nutrientes necesarios; es decir, las sustancias indispensables para que las plantas se desarrollen bien. Los nutrientes principales que requieren las plantas son nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), además de otros elementos como carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O). Los terrenos cultivados consumen lentamente sus nutrientes debido a la toma de éstos por parte de las plantas cultivadas. Ante este desgaste, los fertilizantes químicos aportan los nutrientes que los cultivos necesitan y como consecuencia se obtienen mejores rendimientos (FAO, 2015).

1.11 Efecto de la fertilización química sobre el rendimiento en el cultivo de cacahuete

En regiones productoras de cacahuete como Chihuahua y Sinaloa donde se aplican fertilizantes químicos en una dosis de nitrógeno y fósforo (N-P: 40-60 kg ha⁻¹), se obtienen rendimientos superiores de hasta 2.86 t ha⁻¹. En contraste, en otras regiones como Tehuiztingo, Puebla en donde no se fertiliza químicamente, los rendimientos del cultivo son de 1 t ha⁻¹ (SIAP, 2014).

Sin embargo, es necesario considerar que los fertilizantes químicos no mejoran la calidad del suelo y cuando son usados en exceso, pueden dañar los cultivos y alterar las poblaciones microbianas del suelo (FAO, 2015).

1.12 Efecto de la fertilización química sobre las poblaciones microbianas

Hernández *et al.* (2013) reportaron, en un estudio realizado en Delicias, Chihuahua, una menor población bacteriana (4×10^3 UFC g⁻¹ de suelo) y en particular del grupo *rhizobia* (1×10^2 UFC g⁻¹ de suelo) en suelos dedicados a la actividad agrícola y con

aplicación intensiva de agroquímicos. Estos datos se compararon con los obtenidos de suelos dedicados al cultivo de cacahuate sin aplicación de agroquímicos (con una población bacteriana total de 2.9×10^4 UFC g^{-1} de suelo y del grupo *rhizobia* de 6.6×10^3 UFC g^{-1} de suelo).

En cuanto a las poblaciones de hongos, Yu *et al.* (2015) reportan una mayor abundancia de hongos en suelo fertilizado con nitrógeno, comparado con un suelo fertilizado orgánicamente donde las poblaciones bacterianas y de actinomicetos fueron mayores. Esto puede deberse a los cambios del contenido de materia orgánica, la disponibilidad de los nutrientes o el pH.

Con la finalidad de conocer los cambios en las poblaciones microbianas, se han establecido patrones de medición, como la frecuencia relativa, para cuantificar la población de las especies de hongos presentes en el suelo.

1.13 Patrones de diversidad fúngica: frecuencia relativa

Zak & Willig (2004) explican que, para el análisis de la diversidad fúngica, cada investigador debe establecer una unidad por la cual la presencia-ausencia, biomasa, densidad o frecuencia de las especies pueda ser estimada en espacio y tiempo. Ante esto, la frecuencia de ocurrencia de los hongos puede ser calculada de dos maneras:

$$\text{Frecuencia (\%)} = \frac{\text{unidades de muestra en las que crecieron las especies fúngicas}}{\text{número total de unidades de muestra examinadas}} \times 100 \text{ (1)}$$

Se debe tener en cuenta que la suma de las frecuencias de todas las especies puede exceder el 100% cuando se calcula la frecuencia de ocurrencia de esta manera. Frecuencias estandarizadas, las cuales sumen 100%, pueden ser más deseables. Dividir la frecuencia de cada especie por la suma de todas las especies proporciona la frecuencia relativa, que es una estandarización directa.

$$\text{Frecuencia relativa (\%)} = \frac{\text{número de aislados de cada especie}}{\text{número total de aislados}} \times 100 \text{ (2)}$$

A menudo, la variabilidad entre especies en la frecuencia transmite más información sobre los mecanismos responsables de la ocurrencia de las unidades ecológicas de hongos que la proporcionada únicamente por las medias.

1.14 Contaminación de cacahuate por hongos en campo y durante el almacenamiento

El suelo sirve como reservorio del inóculo de hongos que pueden atacar a los cultivos. En el caso del cacahuate, éste es más susceptible debido a que su fruto se desarrolla bajo el suelo y por ello está en contacto directo con sus poblaciones fúngicas. En este cultivo, la infección puede darse de dos modos posibles: a) los hongos pueden invadir las semillas, sin daños visibles, en plantas con estrés hídrico debido a que una menor humedad de las vainas lo hacen más susceptible y b) las semillas y vainas dañadas permiten la invasión directa desde el suelo (Horn, 2005). Las condiciones ambientales como la temperatura y humedad relativa, también intervienen en la contaminación por hongos, tanto en condiciones de campo como durante el almacenamiento de los granos.

En condiciones de almacenamiento se ha observado que, además de los factores ambientales, la actividad de agua o humedad del grano, así como el período de almacenamiento, pueden contribuir a favorecer la contaminación por hongos. Nakai *et al.* (2008), reportaron que los principales géneros aislados de cacahuate almacenado y monitoreado durante un año fueron *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Drechslera*. El estudio mostró la susceptibilidad del cacahuate a la contaminación con *A. flavus*, lo cual es de gran preocupación por el potencial toxigénico de esta especie.

Las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, pertenecientes a la sección *A. flavi*, son las especies de hongos aflatoxigénicos más estudiados debido a su gran impacto negativo en la agricultura. *A. flavus* se ha encontrado principalmente en cultivos de maíz, colonizando y contaminando los granos con aflatoxina B₁ (AFB₁). A su vez, *A. parasiticus* se ha reportado con mayor prevalencia en cacahuate (Abbas *et al.*, 2009).

1.15 Características de los hongos pertenecientes a la sección *A. flavi*

Las cepas de esta sección se caracterizan por presentar cabezas conidiales globosas a radiales o columnares, de color amarillo-verdoso ligero, amarillo verdoso intenso, marrón olivo o café (marrón). Los conidióforos son incoloros, usualmente

rugosos, pero pueden variar desde lisos a texturas muy rugosas. Las vesículas son globosas o subglobosas en la madurez en especies con cabezas grandes, permaneciendo claviformes o lageniformes en especies de cabezas pequeñas. Son fértiles sobre la mayor parte de su superficie. El esterigmata puede ser uniseriado o biseriado, con ambas condiciones comúnmente vistas en la misma cepa o sobre una sola vesícula. En la mayoría de las especies, cuando maduran, presentan conidios globosos o subglobosos, con rugosidad visible o casi ausente y a menudo muestran considerable variabilidad en el tamaño en función de las cepas. En otras especies, los conidios son elípticos y lisos o delicadamente rugosos (Raper & Fenell, 1965).

Una de las características importantes de los hongos de esta sección es la capacidad de producir aflatoxinas, aunque la capacidad de síntesis de estos metabolitos es una característica de ciertos aislados y no necesariamente de toda una especie. Aislados de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. toxicarius*, *A. arachidicola* y *A. parvisclerotigenus* se han reportado como productores de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ (Pildain *et al.*, 2008).

1.16 Aflatoxinas

La contaminación por aflatoxinas es uno de los principales factores que afectan la calidad de las semillas de interés alimenticio tanto animal como humano, *i.e.*, maíz, sorgo, trigo, cacahuate, algodón y nueces (Cary *et al.*, 2005; Klich, 2007; García *et al.*, 2009).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios, químicamente derivados de difuranocumarinas, producidos principalmente por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Dichos metabolitos son considerados potentes cancerígenos y han sido ligados con cáncer de hígado. Entre las aflatoxinas de mayor importancia están la B₁, B₂, G₁ y G₂. Las letras hacen referencia al color de su fluorescencia bajo luz ultravioleta (es decir, B: "blue"; o G: "green") y el número indica la movilidad que tienen en la cromatografía de capa fina según su peso molecular. La aflatoxina B₁, cuya toxicidad es la más elevada, es la que se detecta con mayor frecuencia (Klich, 2007; Hedayati *et al.*, 2007; Nakai *et al.*, 2008).

1.17 Contaminación por aflatoxinas en cacahuate

Las primeras investigaciones de contaminación por aflatoxinas datan de 1960 en Inglaterra, después de la muerte de aproximadamente 100,000 pavos debido a la ingesta de harina de cacahuate contaminada con toxinas del hongo *A. flavus* (Klich, 2007; Abbas *et al.*, 2009).

A. flavus es la principal fuente de contaminación de aflatoxinas en cacahuate, aunque, como se mencionó anteriormente, la colonización por *A. parasiticus* en cacahuate es más común que en otros cultivos (Barros *et al.*, 2003; Mutegi *et al.*, 2012).

Algunos factores ambientales y prácticas agronómicas durante la siembra y el manejo pre- y post-cosecha del cacahuate pueden predisponerlo a la colonización por hongos productores de aflatoxinas. Por ejemplo, temperatura alta, precipitación pluvial baja, humedad relativa alta ($\geq 70\%$), tipo de suelo (e.g., plantas en suelos arenosos son más susceptibles a estrés hídrico por tener menor disponibilidad de agua), riego del cultivo, asociación con otros cultivos, labranza, y fertilización (e.g., una fertilización nitrogenada suficiente puede minimizar la contaminación por aflatoxinas). Además, el daño por insectos y nemátodos en las vainas puede facilitar la colonización por hongos aflatoxigénicos (Hell *et al.*, 2003; Widstrom *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2013).

1.18 Asociación entre contaminación por aflatoxinas y la fijación biológica de nitrógeno

Algunas investigaciones indican que la tolerancia del cacahuate a la sequía puede ser usado como criterio indirecto de selección para la resistencia a contaminación por aflatoxinas (Arunyanark *et al.*, 2009). Asimismo, en un experimento bajo condiciones de campo, la capacidad del cacahuate para mantener una alta FBN por inoculación con *Bradyrhizobium* bajo condiciones de sequía, tuvo un efecto negativo y significativo sobre la infección de las semillas y la contaminación de aflatoxinas por *A. flavus* (Arunyanark *et al.*, 2012).

II. JUSTIFICACIÓN

El cacahuete es la fuente principal de proteína en comunidades rurales como Tehuiztzingo, Puebla. En este municipio, la producción de esta oleaginosa es baja (1.0 t ha^{-1}) debido a la ausencia de fertilización química del cultivo. Asimismo, se desconoce la significancia de sistemas biológicos benéficos asociados con la fijación biológica de nitrógeno y la toma de fósforo, vía micorriza, que podrían favorecer la producción de este cultivo. Por otro lado, se desconoce si el cultivo en Tehuiztzingo es afectado por hongos productores de aflatoxinas, considerando que el cacahuete es almacenado en condiciones no controladas de humedad e inocuidad.

III. HIPÓTESIS

Los fertilizantes químicos (como fuente de N y P) favorecen la contaminación por aflatoxinas en el cultivo de cacahuete, mientras que el uso de sistemas biológicos (e.g., *Rhizobium* y hongos micorrícicos) la atenúan.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la fertilización química (con N y P) vs. biológica (con *Rhizobium*-hongos micorrícicos arbusculares) sobre la contaminación del cacahuete con hongos aflatoxigénicos.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar físico-químicamente el suelo de Tehuizingo, Puebla.
- 2) Aislar y caracterizar *Rhizobium* de nódulos de cacahuete criollo de Tehuizingo y determinar su capacidad de fijación biológica de nitrógeno.
- 3) Determinar la presencia de hongos aflatoxigénicos en suelo y en granos de cacahuete, así como cuantificar el nivel de aflatoxinas en granos por HPLC.
- 4) Comparar el efecto de la fertilización química (con N y P) vs. biológica (con *Rhizobium*-hongos micorrícicos arbusculares) sobre la población de hongos aflatoxigénicos en la rizósfera y en la subsiguiente contaminación por aflatoxinas en el cultivo de cacahuete, bajo condiciones de invernadero.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Medios de cultivo

La composición de los medios y las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Medios y condiciones de cultivo

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN Y CONDICIONES*
Malta Sal Agar (MSA)	(g L ⁻¹) Extracto de Malta 20, NaCl 60, Agar 20.
Papa Dextrosa Agar (PDA) Difco	39 g L ⁻¹ (según las indicaciones del fabricante).
BD.	
Medio Coco Agar (CAM)	Extracto de Coco <i>Calahua</i> 200 mL, agua destilada 600 mL, Agar 12 g, pH 6.5.
Extracto de Levadura Manitol Agar (ELMA).	(g L ⁻¹) K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2, NaCl 0.1, extracto de levadura 1, manitol 10, agar bacteriológico 15, azul de bromotimol (AB) 0.057, pH 7±0.2.
PIKOVSKAYA (PVK)	(g L ⁻¹) glucosa 10, extracto de levadura 0.5, Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5, NaCl 0.2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1, KCl 0.2, MnSO ₄ ·7H ₂ O 0.002, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.002, Púrpura de bromocresol 0.1, Agar nutritivo 15, pH 7.0. <i>Solución 1:</i> a) Mezclar 10 mL de FeCl ₃ 1 mM (disuelto en HCl 10 mM) con 50 mL de una solución que contenga 1.21 mg mL ⁻¹ de Cromo Azurol S. b) Agitando constantemente, añadir a la mezcla anterior (a) 40 mL de una solución que contenga 1.82 mg mL ⁻¹ de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA o CTAB) por sus siglas en inglés. <i>Solución 2:</i> a) disolver 30.24 g de ácido piperazindietanosulfónico (PIPES por sus siglas en inglés) en 750 mL de una solución de sales que contenga 0.3 g de K ₂ HPO ₄ , 0.5 g de NaCl y 1.0 g de NH ₄ Cl. b) Ajustar el pH a 6.8 usando KOH al 50% (p/ v). c) Agregar 50 mL de agua destilada para llevar la solución a 800 mL. d) Adicionar 15 g de Agar. <i>Solución 3:</i> a) En 70 mL de agua destilada, disolver los siguientes reactivos: 2 g de glucosa, 2 g manitol, 493 mg de MgSO ₄ , 11 mg de CaCl ₂ , 1.17 mg de MnSO ₄ , 1.4 mg de H ₃ BO ₃ , 0.04 mg CuSO ₄ , 1.2 mg de ZnSO ₄ , 1.0 mg de Na ₂ MoO ₄ . <i>Solución 4:</i> a) preparar 30 mL de una solución de casaminoácidos al 10% (p/ v).
Medio Cromo Azurol S (CAS)	Esterilizar por separado las soluciones 1, 2 y 3 a una temperatura de 121 °C y presión de 15 psi, durante 15 min. La solución 4 debe ser esterilizada por filtración a través de una membrana de 0.22 µm. Una vez esterilizadas todas las soluciones, deben mezclarse las

soluciones 2, 3 y 4 mientras se agita constantemente el matraz que las contiene sobre la mesa, todo esto dentro de la campana de flujo laminar. Finalmente se agrega la solución 1, mezclando cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Por último, el medio CAS agar se coloca en cajas Petri para su posterior utilización.

*Condiciones de cultivo: Los experimentos realizados en medios de cultivo sólido (MSA, PDA y CAM) para hongos fueron incubados a 28°C durante 7 d.

Reactivo de Salkowski. Este reactivo se utilizó para determinar la producción de ácido indolacético de los aislados bacterianos y se preparó a partir de 1 mL de FeCl₃ 0.5 M y 50 mL de HClO₄, 35%.

Reactivo Benedict. Este reactivo se utilizó para realizar la prueba de 3-cetolactasa en aislados bacterianos. Su preparación requiere de dos soluciones: la solución A, que contiene Na₃C₆H₅O₇, 17.3 g; Na₂CO₃, 10 g, y agua destilada, 50 mL, y la solución B, que contiene Cu₂SO₄, 1.73 g, y agua destilada, 50 mL.

Solventes

Los solventes empleados para realizar la extracción de aflatoxinas fueron: cloroformo, acetona, éter etílico, metanol tanto grado reactivo como HPLC, además de hexano y acetonitrilo, grado HPLC. Todos los solventes utilizados fueron de la marca Karal (León, Gto., México).

5.2 Material biológico

5.2.1 Cacahuete criollo de Tehuiztingo, Puebla

Se obtuvieron muestras de 1 kg de granos de cacahuete de un lote de 300 kg de cacahuates almacenados durante 5, 11 y 14 meses, en sacos, y durante 11 meses, a granel.

5.2.2 Cepas microbianas

Las cepas microbianas utilizadas en este estudio fueron las siguientes:

- ***Aspergillus parasiticus* ATCC 16992.** Cepa de colección, caracterizada por la producción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.
- ***Rhizobium tropici* CIAT 899 B.** Cepa de referencia, utilizada como control positivo para la identificación de los aislados bacterianos obtenidos de nódulos de cacahuete.

5.3 Sitio de estudio

El municipio de Tehuiztzingo, Puebla está ubicado en la región conocida como la Cuenca del Alto Balsas. Se localiza en la parte suroeste del estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos N: 18° 15' 48", 18° 28' 12" de latitud, y los meridianos O: 98° 09' 06" y 98° 25' 36" de longitud. La temperatura del sitio oscila entre 22°C y 26°C y la humedad relativa es de 47 a 68%.

5.4 Muestreo de suelo en el cultivo de cacahuate criollo

El muestreo del suelo se llevó a cabo en cinco puntos (cinco de oros: las cuatro esquinas y el centro) de una parcela de cultivo de cacahuate criollo de Tehuiztzingo, formando una muestra compuesta, 1 kg, la cual fue tamizada, usando una malla número 10, para su caracterización físico-química.

5.5 Muestreo de plantas de cacahuate y selección de nódulos

Las muestras vegetales fueron obtenidas de una parcela dedicada al cultivo de cacahuate perteneciente al municipio de Tehuiztzingo, Puebla. Se muestrearon 10 plantas de cacahuate cuya etapa fenológica era de 60 días después de la siembra. El muestreo se realizó en forma de "zigzag" (de manera alterna entre uno y otro lado del terreno muestreado).

Se cuantificaron los nódulos totales y efectivos, identificando como efectivos aquéllos que presentaban una coloración rosada en el interior. Ésta es un indicador de la presencia de posibles *rizobios* ya que sugiere la síntesis de leghemoglobina pigmentada (Pérez *et al.*, 2008; Díaz, 2010).

5.6 Caracterización físico-química del suelo de Tehuiztzingo, Puebla

La caracterización del suelo fue realizada de acuerdo a la norma NOM 021 RECNAT 2000 por el Laboratorio de Análisis de Agua, Suelos y Fertilizantes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Campo experimental Bajío en Celaya, Guanajuato.

5.7 Aislamiento de *Rhizobium* en nódulos de cacahuate criollo de Tehuitzingo

5.7.1 Aislamiento primario

Los nódulos se desinfectaron por inmersión sucesiva durante 10 min en etanol 70% e hipoclorito de sodio 10% y enjuagando tres veces con agua destilada estéril. El proceso de desinfección se repitió dos veces (Matos *et al.*, 1998; González, 2012). Posteriormente, los nódulos se trituraron de manera individual con varilla de vidrio en tubos de ensaye estériles que contenían 100 μ L de buffer de fosfatos (KH_2PO_4 0.2% y K_2HPO_4 0.8% p/ v). Se realizó un aislamiento primario colocando una alícuota del triturado del nódulo como inóculo en medio ELMA empleando azul de bromotimol (AB) como indicador. La siembra se realizó por estría y se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h o hasta observar crecimiento abundante en el medio (González, 2012; Hernández *et al.*, 2012).

5.7.2 Aislamiento secundario

Este aislamiento se realizó mediante siembra por estría en placas con ELMA + AB a partir de las colonias obtenidas en el aislamiento primario. Las placas fueron incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 d, observándose el crecimiento y la morfología colonial (Matos *et al.*, 1998). Mediante este procedimiento, se obtuvieron siete aislados bacterianos diferentes.

5.8 Caracterización de *Rhizobium* en nódulos de cacahuate criollo de Tehuitzingo

5.8.1 Caracterización microscópica: Tinción Gram

Se procedió a realizar un frotis bacteriano de cada aislado poniendo una gota de agua destilada en el portaobjetos y se fijó con calor. Se cubrió con cristal violeta por 1 minuto y se lavó con agua destilada. Enseguida, se cubrió con lugol por 1 minuto, se lavó con agua destilada. Se procedió a decolorar con etanol 95% por 1 min y se lavó con agua destilada. Se cubrió con safranina por 1 min, se lavó y dejó secar. Finalmente, las observaciones se realizaron con microscopio de luz (LEICA;

Wetzlar, Alemania) a 100x. Mediante esta técnica se puede distinguir entre bacterias Gram-negativas (tinción rojo-rosado) y las Gram-positivas (azul-violeta).

5.8.2 Pruebas bioquímicas

a) Catalasa. Se tomó una asada de cada cultivo bacteriano, proveniente del aislamiento secundario con medio ELMA, se preparó un frotis y se le aplicó una gota de peróxido de hidrógeno para detectar la actividad de la catalasa de los aislados. La detección es visual, ya que la reacción catalasa positiva es aquella donde las bacterias hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y se forman burbujas (Bou, 2010).

b) 3-cetolactasa. Con la finalidad de distinguir los aislados entre *Rhizobium* y *Agrobacterium* se aplicó la prueba de 3-cetolactasa. Los aislados se sembraron en medio de extracto de levadura lactosa agar, que tiene la misma composición que ELMA, pero se sustituye el manitol por lactosa. Se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta observar crecimiento óptimo. Se adicionaron 5 mL de reactivo Benedict y los resultados se valoraron de acuerdo a la producción de óxido cúprico (CuO_2), siendo positivo (+) un cambio de coloración a amarillo fluorescente que indica que el aislado es *Agrobacterium*. Si no hay cambio de coloración, la prueba es negativa (-) e indica que el aislado es *Rhizobium* (Matos *et al.*, 1998).

c) Resistencia/ susceptibilidad a antibióticos (Antibiogramas). Se realizaron pruebas de resistencia/ susceptibilidad a 12 antibióticos: amikacina (**AK**), 30 μg ; ampicilina (**AM**), 10 μg ; cefepime (**FEP**), 30 μg ; cefalotina (**CF**), 30 μg ; cefotaxima (**CTX**), 30 μg ; ceftriaxona (**CRO**), 30 μg ; cloranfenicol (**CL**), 1 μg ; gentamicina (**GE**), 10 μg ; netilmicina (**NET**), 30 μg ; nitrofurantoína (**NF**), 300 U; trimetoprim-sulfametoxazol (**SXT**), 25 μg ; levofloxacin (**LEV**), 5 μg . Para la realización de los antibiogramas, se creció cultivo bacteriano de los siete aislados de nódulos de cacahuete criollo de Tehuiztzingo (Th1-Th7) y la cepa de referencia *Rhizobium tropici* CIAT 899 B durante 48 h en medio líquido ELM. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó 1 mL de cultivo bacteriano y se agregó en 50 mL de medio ELMA (una vez que se tolerara la temperatura del medio), se homogenizó y vertió en cajas de Petri. Se colocó el multidisco con antibióticos para bacterias Gram negativas (Bio-Rad; Hercules, CA, EUA) sobre el medio gelificado y se incubaron

las cajas a 30°C durante 48 h. Después de este tiempo se realizó la lectura, considerando que el aislado fue susceptible si mostró ausencia de crecimiento bacteriano o resistente si hubo crecimiento bacteriano. La prueba se realizó por duplicado.

5.8.3 Evaluación de la producción de metabolitos de promoción de crecimiento vegetal por los aislados bacterianos

a) Producción de auxinas: detección de grupos indol. La cuantificación de auxinas se realizó por la reacción de Salkowski, método colorimétrico fundamentado en la formación de un cromógeno rosado entre el ácido indolacético (AIA) y los iones férricos en medio de ácido perclórico (Bonilla, 2005). Para la prueba se inocularon matraces Erlenmeyer con 15 mL de medio ELM (con y sin triptófano [Trp], 100 ppm) con 15 µL de inóculo (tomado de medio ELM sin AB) por triplicado y se incubaron a 28°C por 24 h en agitación constante a 100 rpm. Se tomó 1 mL del caldo bacteriano en microtubos Eppendorf y se centrifugó en microcentrífuga (Thermo Modelo Sorvall. Biofuge; Waltham, Massachusetts, EUA) a 10,000 rpm durante 5 min. Se tomaron 100 µL de sobrenadante y se depositaron en caja de ELISA, se agregaron 200 µL de Reactivo de Salkowski y la mezcla se dejó reaccionar en un área sin presencia de luz durante 25 min a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Tecan A-5082 Modelo Genios; Männedorf, Zurich, Suiza). Para determinar la concentración de compuestos indolacéticos se elaboró una curva estándar de ácido indolacético (Tsavkelova, *et al.*, 2007; Celis & Gallardo, 2008). La medición se realizó por triplicado.

b) Producción de sideróforos. Para determinar la posible producción de sideróforos, se realizó la técnica en medio CAS agar, que indica la producción de estos metabolitos mediante un cambio de coloración en el medio de cultivo de azul a naranja (Alexander & Zuberer, 1991). Los aislados fueron sembrados por punción en medio sólido CAS, se incubaron a 35 ± 2°C por 72 h. A las 24 h se realizó la revisión de cambio de color del medio CAS agar registrándose como positivo para la producción de sideróforos.

c) Solubilización de fosfato inorgánico. Los aislados se sembraron por punción en medio sólido PVK y se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Nautiyal, 1999). Este medio de color púrpura indica la solubilización de fosfato inorgánico cuando se presenta un cambio de color del medio, de púrpura a amarillo, además de la formación de un halo transparente alrededor de la colonia. Estos cambios indican la solubilización bacteriana del fosfato inorgánico.

5.9 Determinación de la capacidad de los aislados bacterianos para fijar nitrógeno

Se cuantificó la actividad nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA, por sus siglas en inglés), para lo cual las raíces noduladas se colocaron en frascos de vidrio de 300 mL cerrados herméticamente usando una tapa adaptada con un tapón serológico para facilitar la extracción de 10% del volumen de aire del frasco y sustituirlo por acetileno (99.95% de pureza; AGA, Caracas, Venezuela). Los frascos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra de cada frasco mediante una aguja de doble pico en tubos de recolección Vacutainer (Knowles, 1982). Las muestras fueron guardadas a temperatura ambiente para su posterior análisis en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (HP; Palo Alto, California, EUA) equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna HP-PLOT/Q (50 m \times 0.23 mm de diámetro interno), utilizando helio como gas acarreador (1 mL min^{-1}), hidrógeno (45 mL min^{-1}), N_2 (10 mL min^{-1}), aire (450 mL min^{-1}). Las temperaturas de corrida fueron: inyector 110°C , horno 60°C y detector 160°C . Se utilizó acetileno y etileno como referencia.

6.0 Determinación la presencia de hongos aflatoxigénicos en suelo y en granos de cacahuate, así como el nivel de aflatoxinas en grano por HPLC

6.0.1 Determinación de la frecuencia relativa del grupo *Aspergillus flavi*, *A. nigri* y otras especies en el cultivo de cacahuate criollo

a) Aislamiento de la población fúngica a partir de suelo y de cáscara de cacahuate. A partir de una muestra de 1 kg de suelo obtenido de una parcela de

cultivo de cacahuate criollo de Tehuiztzingo, se tomaron tres submuestras de 10 g para el aislamiento y se resuspendieron en 90 mL de agua destilada estéril en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se agitaron por 1 h a 100 rpm y después se tomó 1 mL de la suspensión de suelo para adicionarlo a 9 mL de agua destilada estéril en tubos de ensayo para las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} .

Se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de medio malta sal agar (MSA) por duplicado. Se utilizó el medio malta sal agar tomando en cuenta que los hongos del género *Aspergillus* son halofílicos. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 6 d. Después del tiempo de incubación, se realizó el conteo de colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC g^{-1} suelo) y por gramo de cáscara respectivamente (UFC g^{-1} cáscara).

Para el aislamiento a partir de cáscara de cacahuate se procedió de manera similar a la descrita para suelo. La única modificación fue el empleo de 10 g de cáscara y 90 mL de una solución acuosa de Tritón al 0.01% para preparar las diluciones decimales seriadas.

b) Aislamiento de la población fúngica de granos de cacahuate recién cosechado y almacenado. Para el aislamiento fúngico de granos de cacahuate se utilizaron 100 granos de cacahuate distribuidos en 10 mitades de cacahuate por caja de Petri (Figura 2). Así, por cada repetición se utilizaron 10 cajas Petri con MSA. Las placas se incubaron a 28°C y a partir de las 72 h se realizaron observaciones del crecimiento fúngico en cada uno de los granos de cacahuate, los datos numéricos de unidades formadoras de colonias se utilizaron para determinar la incidencia fúngica expresada en porcentaje. También, se identificaron los diferentes tipos de colonias fúngicas basados en características macroscópicas.



Figura 2. Caja Petri con medio malta sal agar con 10 mitades de granos de cacahuete criollo.

6.0.2 Identificación macro y microscópica de los aislados fúngicos del grupo *A. flavi*

Aquellos hongos con apariencia de posibles *A. flavus* o *A. parasiticus* fueron aislados en medio MSA por colonia gigante y posteriormente fueron resembrados en medio papa dextrosa agar (PDA). Las placas se incubaron a 28°C durante seis días para realizar la descripción macroscópica de las colonias, así como la identificación microscópica.

Para conocer la especie de *Aspergillus* a la que pertenecían las colonias fúngicas aisladas, se realizaron preparaciones directas con azul de lactofenol para observar al microscopio. Las morfologías observadas al microscopio se compararon con las reportadas y siguiendo las claves taxonómicas para la identificación de las especies fúngicas (Samson *et al.*, 2010).

6.0.3 Determinación de aflatoxinas en granos de cacahuete almacenados a diferentes tiempos en sacos y a granel

a) **Métodos de extracción.** Para determinar la contaminación natural de las muestras de cacahuete con aflatoxinas se utilizaron tres métodos de extracción. Todas las muestras fueron molidas finamente en una licuadora Osterizer (Oster; La Florida, Madrid, España), tamizadas por malla # 20 mesh y homogenizadas para tomar las cantidades que requiere el método por cuarteo para tener submuestras representativas.

Método 1. Método 991.31 de la “Association of Official Analytical Chemists (AOAC)” adaptado por Guzmán-de-Peña *et al.* (Comunicación personal). Este método fue utilizado para procesar las muestras de cacahuates almacenados en sacos y a granel durante 5 y 11 meses, respectivamente. Las muestras de 1 kg provenían de un lote de 300 kg. Una vez molidas las muestras se tomaron 5 submuestras de 20 g y fueron procesadas de la siguiente manera:

- 20 g de cacahuete se colocaron en frascos de vidrio de 300 mL de volumen.
- Se agregaron 80 mL de cloroformo y se dejaron reposar 30 min y posteriormente se agitaron por 5 min.
- La mezcla se filtró a través de papel Whatman poro grueso contenido en un embudo Buchner, utilizando vacío.
- Al filtrado obtenido se le añadieron 40 mL de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- La fase clorofórmica se separó de la solución de amonio después de mezclarlas en embudo de separación.
- La fase clorofórmica se filtró a través de 5 g de NaSO_4 anhidro contenido en papel filtro poro grueso en un embudo sencillo.
- El filtrado se evaporó hasta sequedad en baño María (68°C).
- El residuo se resuspendió con 4 mL de metanol (MeOH) grado HPLC, se trasladó a un vial ámbar de 5 mL (incluyendo la grasa) y se refrigeró durante 21 h.
- La fracción metanólica se separó de la grasa con la ayuda de una pipeta Pasteur, y se dispensó en otro vial limpio.
- Se agregaron otros 2 mL de MeOH al residuo que contenía la grasa y se volvió a refrigerar por 21 h.
- La fracción metanólica fue recuperada como se indicó anteriormente y se juntó con la primera.
- Las fracciones metanólicas se concentraron a 1 mL en baño María (68°C).
- El extracto obtenido se limpió de partículas por medio de una fase sólida (packing type C-18; Grace; Columbia, Maryland, EUA). Los extractos se guardaron en refrigeración para su posterior identificación por cromatografía de

capa fina y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV).

A partir de las 2 muestras de cacahuete almacenadas en sacos (5 meses) y a granel (11 meses) se tomaron 5 submuestras de 20 g cada una. Y se tomaron 3 submuestras más para añadirles una cantidad conocida de estándar de AFB₁ (25.4 µg mL⁻¹) como control interno del método.

Método 2. Método oficial 993.17 AOAC (AOAC, 1995). Este método fue utilizado para procesar la muestra de cacahuete almacenado en sacos durante 11 meses. La muestra de 1 kg provenía de un lote de 300 kg. Una vez molidas las muestras se tomaron 5 submuestras de 25 g y fueron procesadas de la siguiente manera:

- 25 g de cacahuete molido se colocaron en frascos de vidrio de 300 mL de volumen.
- Se agregaron 100 mL de metanol: agua (85: 15 v/ v) y se agitó manualmente de manera vigorosa con varilla de vidrio, 2 veces durante 10 s.
- Se dejó en reposo durante 23 h.
- La mezcla se filtró a través de papel Whatman poro grueso contenido en un embudo Buchner, utilizando vacío.
- A 20 mL del filtrado se le añadieron 20 mL de solución de NaCl 10% y 12.5 mL de hexano. Se agitó la mezcla durante 1 min en embudo de separación.
- La fase acuosa se drenó en un segundo embudo de separación.
- Se extrajo la parte acuosa con dos porciones de 12.5 mL de cloroformo (agitando 1 min cada vez).
- La fase clorofórmica se filtró a través de 7 g de NaSO₄ anhidro contenido en papel filtro poro grueso en un embudo sencillo.
- El filtrado se evaporó hasta sequedad en baño María (68°C).
- El residuo se resuspendió con 1.2 mL de metanol grado HPLC.
- Así, el extracto obtenido se limpió de partículas por medio de una fase sólida (Packing type C-18) y se llevó a 1 mL.

- Los extractos se guardaron en refrigeración para su posterior identificación por cromatografía de capa fina (TLC) y se determinó el nivel de aflatoxinas mediante HPLC. La determinación se realizó con cinco réplicas.

Se tomaron 5 submuestras de 25 g cada una y se les adicionó un volumen determinado de estándar de AFB₁ (25.2 µg mL⁻¹) como control interno del método.

Método 3. Método oficial 993.17 AOAC adaptado por Guzmán-de-Peña et al. (Comunicación personal). La modificación realizada al método fue emplear 40 mL del filtrado obtenido en el paso 4 del método oficial y se siguieron los pasos del protocolo tal como se describió en el apartado Método 2.

- b) **Identificación de AFB por cromatografía de capa fina.** Se aplicaron 25 µL de los extractos obtenidos en cada método y 20 µL de un estándar de AFB₁ y AFG₁ (22.6 µg mL⁻¹ y 27.9 µg mL⁻¹) con microjeringa Hamilton de 25 µL, en placas de TLC de aluminio silica gel 60 W, 20 x 20 cm, (Merck; Kenilworth, Nueva Jersey, EUA). Se utilizaron como solventes 100 mL de éter etílico en la primera cámara de vidrio y una solución de cloroformo: acetona (85: 15 v/ v) en la segunda cámara. Las placas de TLC se observaron bajo luz UV de longitud larga en cámara de luz UV Chromato-Vue modelo CC-20G (UVP; Upland, California, EUA) para identificar por fluorescencia la presencia de AFB en muestras de cacahuete.
- c) **Cuantificación del nivel de aflatoxinas por HPLC.** Para realizar la cuantificación por HPLC-UV se utilizaron soluciones estándar de aflatoxinas de concentración conocida para determinar el tiempo de retención. También se realizó una curva de concentración del estándar de AFB₁. Posteriormente, los extractos fueron inyectados en el HPLC utilizando una alícuota de 20 µL.

La determinación del nivel de aflatoxinas se realizó en un equipo de cromatografía de alta resolución (HPLC) Agilent Technologies 1200 (ABC Instrumentación Analítica S. A. de C. V.; Ciudad de México, D.F, México), y el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies; Santa Clara, California, EUA). La fase móvil se compone de dos mezclas de solventes: a) agua: acetonitrilo: metanol (60: 20: 20 por volumen) y b) metanol 100%. Se utilizó una proporción de 75% de A y 25 % de B. El método empleado es isocrático y sus características de corrida son: una

duración de 10 min, flujo de 1 mL/ min, a 25°C, volumen de inyección 20 µL y detección a una longitud de onda de 364 nm. Se utilizó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C-18 Agilent, 4.6 x 150 mm, partícula de 5 µm (Agilent Technologies; Santa Clara, California, EUA). Al iniciar y finalizar el análisis se inyectó un estándar de AFB₁.

6.0.4 Determinación de la capacidad micotoxigénica de los *Aspergilli* aislados de granos de cacahuete por un método presuntivo

El medio coco agar (CAM) se empleó como método presuntivo para determinar la capacidad de producción de aflatoxinas de los *Aspergilli* aislados de cacahuete criollo. Este medio permite identificar la producción de aflatoxinas por *Aspergillus* spp. Cuando las colonias muestran fluorescencia azul o verde al ser observadas bajo luz UV se catalogan como presuntas positivas (Lin & Dianese, 1976). Los aislados fúngicos de granos de cacahuete criollo fueron sembrados por colonia gigante en medio CAM por duplicado y se incubaron a 28°C. A partir de las 72 h de incubación se realizó la lectura de las placas bajo luz UV. Se utilizó como control positivo, la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 con capacidad de producción de aflatoxinas.

6.0.5 Cuantificación de aflatoxinas en los extractos provenientes de los aislados presuntamente positivos para síntesis de AFB₁

A partir de los aislados fúngicos crecidos en medio CAM se efectuó la extracción de aflatoxinas por el método de extracción Keller 2. Mediante un sacabocado de 1.1 cm flameado y frío, se delimitó una porción del centro de la colonia fúngica (por duplicado), dividiendo en 4 partes el círculo con un bisturí y colocando los segmentos en microtubos Eppendorf, añadiendo 500 µL de agua destilada y agitación. Posteriormente fueron agregados 500 µL de cloroformo; se agitó con vórtex y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm. La fase orgánica (del fondo) se pasó a un vial ámbar y se evaporó a sequedad en baño María. Finalmente, se resuspendió con 300 µL de cloroformo (Jin *et al.*, 2002). Se realizó cromatografía

de capa fina (TLC) y se cuantificó el nivel de aflatoxinas mediante HPLC (de acuerdo a lo descrito en los apartados 6.0.3 b y c).

6.1 Ensayos en invernadero

6.1.1 Ensayos de nodulación bajo condiciones de invernadero

Para confirmar la capacidad de nodulación de los aislados obtenidos de nódulos de raíz de cacahuate criollo se realizaron dos ensayos. Para la realización de los ensayos, las semillas de cacahuate se esterilizaron superficialmente (desinfestaron) de la siguiente manera: se introdujeron 50 semillas en un sobre de papel filtro, sumergiéndolas en una solución con detergente comercial “ROMA” (Fábrica de Jabón la Corona; Ecatepec, Edo. de México, México) a una concentración de 0.02 g mL⁻¹ durante 20 min con agitación constante. Se lavaron con agua destilada y después de ello se sumergió el sobre con semillas en etanol 70% (v/v) durante 30 s. Seguido de una solución de hipoclorito de sodio 10% (v/v) adicionando 0.1 mL de Tween 20 durante 20 min con agitación constante. Nuevamente se sumergió el sobre en etanol 70% durante 1 minuto y se realizaron tres lavados con 50 mL de agua destilada (Cruz, 2013). Finalmente, las semillas se colocaron en frascos con algodón húmedo para su germinación durante cuatro días.

Ensayo 1. Las semillas germinadas de cacahuate fueron inoculadas directamente con los aislados obtenidos de nódulos de cacahuate criollo de Tehuitzingo de manera independiente (Th1-Th7) con 10 mL de inóculo bacteriano a una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹ y fueron sembradas en suelo franco arenoso de la comunidad “El Copalillo”, Irapuato, Gto. Fue utilizado como control negativo suelo franco arenoso estéril de Copalillo sin adición de inóculo bacteriano. Se emplearon tres semillas germinadas por aislado bacteriano.

Ensayo 2. Se inocularon semillas germinadas de cacahuate con los aislados Th1-Th7 de manera independiente (10 mL de inóculo bacteriano a una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹) y fueron sembradas en arena estéril. Se fertilizaron químicamente tres macetas con la dosis recomendada por el INIFAP (N-P-K, 40-60-0) utilizando sulfato de amonio como fuente de N y superfosfato triple como fuente de P. Se utilizó

arena estéril como control negativo sin adición de inóculo bacteriano. Para cada ensayo se emplearon tres semillas germinadas por aislado bacteriano.

En ambos ensayos, las plantas de cacahuete fueron cosechadas a los 60 d después de la siembra (dds) y se cuantificó la actividad de la enzima nitrogenasa a través de la técnica de reducción de acetileno en raíces tal como se describió en el apartado 5.9. Asimismo, se realizó la cuantificación del número de nódulos totales y de nódulos efectivos usando la presencia de leghemoglobina como parámetro.

6.1.2 Ensayo de invernadero para comparar el efecto de la fertilización química (con N y P) vs. biológica (con *Rhizobium*-hongos micorrícicos arbusculares) sobre la población de hongos aflatoxigénicos en la rizósfera y en la contaminación por aflatoxinas en el cultivo de cacahuete

a) Establecimiento del ensayo

En condiciones de invernadero, se sembraron tres semillas de cacahuete criollo (desinfestadas previamente de acuerdo al apartado 6.1.1) por cada maceta con 16 kg de suelo de Tehuiztingo, aplicándose siete diferentes tratamientos con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron: A) suelo en condiciones naturales (sin esterilizar, sin fertilizar y sin inocular); B) suelo + Fertilización química (10 ppm N- 15 ppm P usando sulfato de amonio y superfosfato triple, respectivamente); C) suelo + *Rhizobium* (10^9 UFC mL⁻¹); D) suelo + *A. parasiticus* (1×10^6 esporas mL⁻¹); E) suelo + fertilización química (N y P) + *A. parasiticus*; F) suelo + *Rhizobium* + *A. parasiticus*; G) suelo + *Rhizobium* + consorcio de hongos micorrícicos arbusculares del género *Glomus* (10 g semilla⁻¹) + *A. parasiticus*.

Al momento de la siembra, se inocularon las macetas del tratamiento G con 10 g del inóculo del consorcio de HMA del género *Glomus* (12 esporas g⁻¹ de sustrato). Este consorcio, conformado por las especies *G. intraradices*, *G. albidum*, *G. diaphanum*, y *G. claroideum*, fue donado por el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

La preparación del inóculo de *A. parasiticus* se realizó cultivando 100 µL de una suspensión de esporas en cajas de PDA por duplicado. Las placas se incubaron

durante 6 d a 30°C, después de lo cual se realizó una suspensión de esporas con 25 mL de agua destilada estéril con Tritón 0.01%. Se aplicó choque térmico a la suspensión (dejando 24 h en refrigeración) y al día siguiente se determinó el número de esporas mL⁻¹ mediante conteo en cámara de Neubauer. Se prepararon diluciones con la solución acuosa con Tritón 0.01% para obtener una concentración final de 1x 10⁶ esporas mL⁻¹. Dos días antes de la inoculación se determinó la viabilidad de las esporas, sembrando diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en cajas de PDA.

Para el caso de las cepas bacterianas (Th1 y Th5), éstas se cultivaron en 30 mL de medio ELM y se incubaron a 28°C, en agitación constante a 100 rpm durante 20 y 72 h, respectivamente. Después de este tiempo, se centrifugaron dos veces a 4500 rpm durante 10 min, realizando lavados con solución salina (NaCl 0.85%) después de centrifugar. Finalmente, se resuspendió la pastilla formada en 15 mL de solución salina con la finalidad de ajustar la concentración a 1 x 10⁹ UFC mL⁻¹.

A los 20 dds, cuando las plantas de cacahuete ya habían emergido, se raleó con la finalidad de dejar sólo una planta por maceta. En los tratamientos señalados, se inoculó con 1 mL de suspensión bacteriana a una concentración de 1 x 10⁹ UFC mL⁻¹ y/o 1 mL de *A. parasiticus* (1 x 10⁶ esporas mL⁻¹) y se fertilizó químicamente. La inoculación de microorganismos y la aplicación del fertilizante se realizaron en tres puntos equidistantes cerca de la raíz de las plantas.

Los parámetros a evaluar en el ensayo de invernadero fueron: número de nódulos totales y efectivos por planta, actividad de reducción de acetileno en $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, nitrógeno en mg N planta⁻¹, fósforo en mg P planta⁻¹, porcentaje de micorrización, biomasa seca en parte aérea y radicular, en g planta⁻¹, producción de granos en g planta⁻¹ y nivel de aflatoxinas en granos de cacahuete, en $\mu\text{g AFB}_1 \text{ g}^{-1}$ muestra al momento de la cosecha realizada a los 160 dds. Asimismo, se evaluó el efecto sobre la población bacteriana y fúngica a los 45 y 90 dds.

b) Determinación de la población bacteriana en suelo de cultivo

Para evaluar el efecto de la fertilización química y la inoculación bacteriana *Rhizobium* sobre la población microbiana en el suelo de cultivo, se realizaron

diluciones seriadas de muestras de suelo tomadas de cada tratamiento del ensayo de invernadero a los 45 y 90 dds. Se sembraron 100 μL de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} por duplicado, en agar nutritivo para el aislamiento de bacterias. El conteo de UFC se realizó a las 48 h y se determinó su número por gramo de suelo.

c) Determinación de la incidencia fúngica total y de posibles *Aspergillus* del grupo *A. flavus* en suelo de cultivo

Los muestreos de suelo se realizaron a los 45 y 90 dds. Para evaluar la incidencia fúngica se empleó el método descrito en el apartado 6.0.1 a). Determinando el número de UFC g^{-1} de suelo después de 7 d de incubación.

Se aislaron los hongos que presentaron características del grupo *A. flavus*. Éstos se observaron al microscopio para su identificación.

d) Evaluación del efecto de la fertilización química y biológica en las características fisiológicas y nutricionales del cultivo de cacahuate

A los 160 dds, las plantas de cacahuate fueron cosechadas y se cuantificó la actividad de la enzima nitrogenasa (de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.9), con la finalidad de determinar la FBN en el cultivo de cacahuate. Asimismo, se realizó la cuantificación de nódulos totales y efectivos.

El contenido de nitrógeno total en las plantas de cacahuate se determinó en un analizador elemental orgánico Thermo Scientific Flash serie 2000 (Waltham, Massachusetts, EUA). En este equipo se colocó 1 g de muestra para el análisis.

Para la determinación de fósforo se utilizó el método Vanadio-Molibdato (Vera-Núñez *et al.*, 2006). Para ello se colocaron 100 mg de muestra vegetal molida de cada tratamiento por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 10 mL de ácido nítrico, se homogenizó la mezcla y se digirieron a 60°C . Al evaporarse el ácido nítrico, se añadieron 10 mL de ácido nítrico: perclórico (5: 1 v/ v) para terminar la oxidación de la materia orgánica, (siempre y cuando la muestra no presentara una coloración naranja, de lo contrario se continuó la digestión con ácido nítrico). Al término de la digestión, las sales de color blanquecino se resuspendieron en agua destilada, se filtraron con papel Whatman No. 42 y se aforaron a 10 mL.

Posteriormente, se colocaron 200 μL de las muestras obtenidas de la filtración y 50 μL de la solución reveladora Vanadio-Molibdato en una placa de Elisa, la cual se dejó en reposo a oscuridad durante 20 min. Se midió la absorbancia a 415 nm en espectrofotómetro TECAN A-5082, modelo GENIOS (TECAN, Männedorf, Zurich, Suiza) (Vera-Núñez *et al.*, 2006). La determinación se realizó por triplicado y se usó un blanco negativo. Se realizó una curva de calibración de fósforo (1, 3, 6, 12, 25 y 50 ppm), para lo cual se partió de una solución de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) equivalente a 500 ppm de P.

e) Determinación de la colonización del consorcio micorrícico en raíces de cacahuete cultivado en invernadero

Esta determinación se realizó sólo para dos tratamientos A y G. Se tomaron 20 segmentos de las raíces de cada planta de los tratamientos indicados por separado. Las raíces contenidas en viales recibieron el siguiente tratamiento: adición de 2 mL de KOH al 10% y se sometieron a 10 lb de presión durante 10 min. Se lavaron las raíces con agua corriente y se adicionaron 2 mL de HCl 1%, dejando en reposo durante 4 min. Se decantó el HCl y se agregaron 2 mL de azul de tripano. Se sometieron 10 min a 10 lb de presión, se desechó el colorante y se mantuvieron en acetoglicerol hasta su observación. Las observaciones se realizaron con microscopio de luz (LEICA [Wetzlar, Alemania]) a 40x (Kormanik & Mc Graw, 1982).

f) Determinación del nivel de aflatoxinas en granos de cacahuete cultivado en ensayo de invernadero (Método AOAC 993.17 adaptado por Guzmán-de-Peña *et al.*, Comunicación personal)

La extracción de aflatoxinas de granos de cacahuete cosechados en el ensayo de invernadero, se realizó de acuerdo al método 3, empleando 1 g de muestra de cacahuete molido en un molino de postas (Retsch, Inc; Newtown, Pensilvania, EUA).

- A 1 g de muestra se le añadieron 8 mL de la solución metanol: agua (85:15).
- La mezcla se agitó en un agitador a 150 rpm durante 30 minutos.

- La mezcla se filtró a través de papel Whatman poro grueso contenido en un embudo Buchner, utilizando vacío.
- Al filtrado obtenido se añadieron 8 mL de solución de NaCl 10% en un embudo de separación.
- Se agregaron 5 mL de hexano y se agitó durante 1 min.
- La fase acuosa se drenó en un segundo embudo de separación.
- Se extrajo la parte acuosa con dos porciones de 5 mL de cloroformo agitando 1 min en cada extracción.
- La fase clorofórmica se filtró a través de 1 g de NaSO₄ anhidro contenido en papel filtro poro grueso en un embudo sencillo.
- El filtrado se evaporó hasta sequedad en baño María (68°C).
- El residuo se resuspendió con 1.2 mL de metanol grado HPLC.
- El extracto se limpió de partículas por medio de una fase sólida (Packing type C-18) y se llevaron a 1 mL.
- Los extractos se guardaron en refrigeración para su posterior identificación por HPLC. La determinación se realizó por triplicado para cada tratamiento.

6.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un ANOVA y con la prueba de rango múltiple del método de Duncan por medio del sistema estadístico SPSS Statistics versión 17.0 a un nivel de significancia $P \leq 0.05$, para determinar diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

VI. RESULTADOS

6.1 Caracterización físico-química del suelo utilizado en el cultivo de cacahuate en Tehuiztingo, Puebla

La caracterización físico-química del suelo del sitio de estudio, mostró una textura franco-arenosa con un pH de 7.72; es decir, moderadamente alcalino, y un contenido de materia orgánica bajo (de 0.79%). Con respecto al contenido de macronutrientes se detectó lo siguiente: 8.41 ppm de nitrógeno (moderadamente bajo); 7.83 ppm de fósforo (bajo) y 309 ppm de potasio (moderadamente alto).

6.2 Aislamiento de *Rhizobium* de nódulos de cacahuate criollo

Las plantas de cacahuate criollo presentaron nodulación natural, lo cual indica la presencia de *Rhizobium* en el suelo con capacidad de infección y efectividad nodular (Figura 3). Los nódulos de cacahuate criollo eran de tipo indeterminado, presentaban forma ovalada a cilíndrica, de tamaño variable (había grandes y pequeños) y distribuidos tanto en la raíz principal como en las raíces laterales. El porcentaje de viabilidad de los nódulos fue del 89% (Tabla 6).

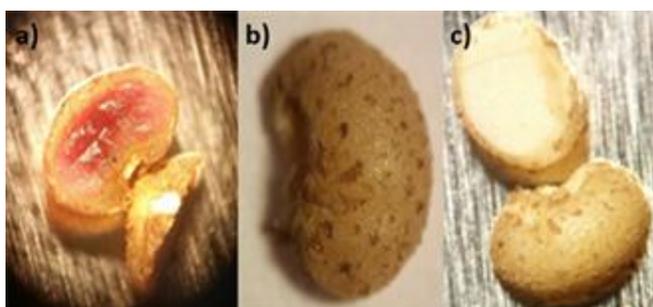


Figura 3. Nódulos de cacahuate criollo de Tehuiztingo, Puebla. a) Nódulo efectivo, con leghemoglobina en el interior; b) vista superior de nódulo y c) nódulo no efectivo, sin presencia de leghemoglobina.

Tabla 6. Nodulación de cacahuate criollo

Característica	Valor*
Nódulos (No. planta ⁻¹)	193 ± 0.50
Masa nodular (g planta ⁻¹)	0.68 ± 0.16
Viabilidad de nódulos (%)	89 ± 0.05

*Los valores son media de 10 plantas.

El aislamiento de las colonias bacterianas que crecieron en medio ELMA, presentaron morfología circular con consistencia mucosa y acidificación del medio (Figura 4a). También se observaron colonias circulares de menor diámetro que alcalinizaban el medio de cultivo (Figura 4b). Se obtuvieron siete aislados bacterianos (los cuales se nombraron con las iniciales del sitio de estudio y un número consecutivo, de Th1 a Th7), con morfología bacilar Gram negativos, catalasa positivos y reacción negativa a la prueba 3-cetolactasa, lo cual, en esta etapa, permitió inferir que estos aislados eran presuntos *Rhizobium* y no *Agrobacterium*.

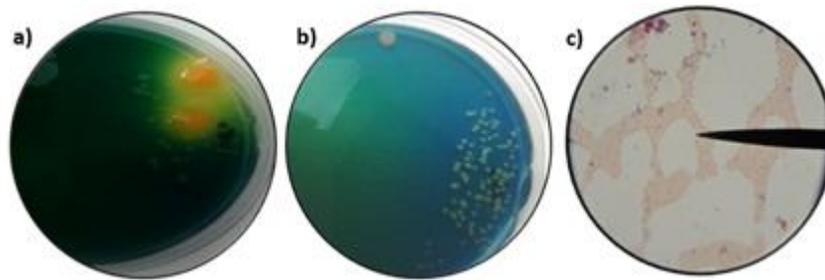


Figura 4. Colonias bacterianas aisladas de nódulos de cacahuete.

a) Posibles *Rhizobium* sp.; b) Posibles *Bradyrhizobium* sp., y c) Aislado Gram - con morfología bacilar.

6.3 Caracterización de *Rhizobium* de nódulos de cacahuete criollo

6.3.1 Resistencia/ Susceptibilidad a antibióticos (Antibiogramas)

Los aislados bacterianos presentaron diferente respuesta de susceptibilidad/resistencia a los antibióticos. Dichos aislados se agruparon en cinco grupos. En grupo 1, aislados Th1 y Th3 (resistentes a AM, CF, CTX, CL, NF, SXT); en grupo 2, aislados Th2 y Th4 (resistentes a AM, CF, CTX, CRO, CL, NF y SXT), y en los grupos 3-5, aislados Th5, Th6 y Th7, respectivamente, los cuales presentaron diferentes patrones de resistencia/ susceptibilidad (Tabla 7). Asimismo, la cepa de referencia *Rhizobium tropici* CIAT 899 B presentó un patrón de resistencia/ susceptibilidad diferente a los aislados de nódulos de cacahuete, siendo resistente a ocho de los doce antibióticos examinados (Tabla 7).

Tabla 7. Resistencia o susceptibilidad a antibióticos por los aislados bacterianos obtenidos de nódulos de cacahuate criollo de Tehuitzingo

Aislado	AK	AM	FEP	CF	CTX	CRO	CL	GE	NET	NF	SXT	LEV
Th 1	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
Th 3	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
Th 2	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S
Th 4	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S
Th 5	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S
Th 6	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S
Th 7	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S
<i>R. tropici</i>	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S

Antibióticos: Amikacina **AK**, 30 mcg; Ampicilina **AM**, 10 mcg; Cefepime **FEP**, 30 mcg; Cefalotina **CF**, 30 mcg; Cefotaxima **CTX**, 30 mcg; Ceftriaxona **CRO**, 30 mcg; Cloranfenicol **CL**, 1 mcg; Gentamicina **GE**, 10 mcg; Netilmicina **NET**, 30 mcg; Nitrofurantoína **NF**, 300 U; Trimetoprim-Sulfametoxazol **SXT**, 25 mcg; Levofloxacina **LEV**, 5 mcg. **S**, susceptibilidad; **R**, resistencia.

6.3.2 Evaluación de la producción de metabolitos asociados a la promoción de crecimiento vegetal en los aislados bacterianos

Los aislados Th1, Th2, Th3 y Th4 mostraron producción de ácido indolacético, sideróforos y solubilización de fosfatos (Figura 5), mientras que Th5, Th6 y Th7 sólo produjeron ácido indolacético (AIA). La cepa de referencia *Rhizobium tropici* CIAT 899 B mostró la mayor producción de AIA ($44.71 \mu\text{g mL}^{-1}$ medio de cultivo), seguida de Th4 ($34.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ medio de cultivo), mientras Th7 fue el aislado con menor producción de AIA ($8.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ medio de cultivo) (Tabla 8).

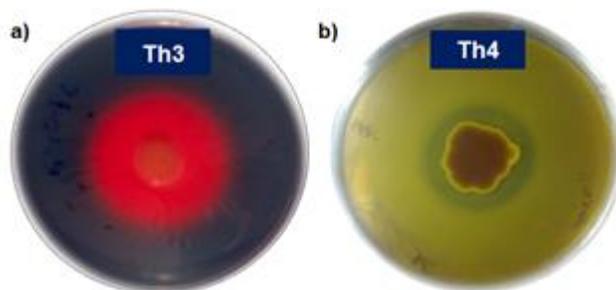


Figura 5. Resultado positivo de producción de sideróforos en aislado Th3 (a) y de solubilización de fosfatos en el aislado Th4 (b).

Tabla 8. Producción de ácido indolacético (AIA) de los aislados bacterianos (Th1 a Th7) obtenidos de nódulos de cacahuate criollo

Aislado	Th1	Th2	Th3	Th4	Th5	Th6	Th7	* <i>R. tropici</i>
AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	16.11 \pm 0.69	12.28 \pm 0.35	13.25 \pm 0.87	34.19 \pm 1.05	10.27 \pm 0.12	9.69 \pm 0.30	8.24 \pm 0.18	44.71 \pm 1.36

* Los valores representan la Media \pm SD (n=3). Curva de calibración de AIA (Apéndice 1). *R. tropici* se empleó como microorganismo de referencia.

6.4 Determinación de la capacidad de los aislados bacterianos para fijar nitrógeno

De acuerdo con la efectividad nodular estimada por la presencia de leghemoglobina, los valores de actividad de reducción de acetileno oscilaron entre 216.42 y 479.30 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}$ de nódulo h^{-1} .

6.5 Determinación la presencia de hongos aflatoxigénicos en suelo y en granos de cacahuate, así como el nivel de aflatoxinas en grano por HPLC

6.5.1 Determinación de la frecuencia relativa del grupo *Aspergillus flavi*, *A. nigri* y otras especies en el cultivo de cacahuate criollo

a) Población fúngica en suelo utilizado para el cultivo de cacahuate criollo de Tehuiztzingo, Puebla

La población fúngica total fue de 7.33×10^7 UFC g^{-1} suelo. Las características macroscópicas de los hongos presentes en el suelo correspondieron con: a) *Aspergillus flavi*, amarillo granuloso, posiblemente *A. oryzae*; b) *Rhizopus*, colonias blancas filamentosas con gránulos negros en las puntas, y c) otras especies, formando colonias amarillo polvosas, gris polvosas, gris algodonosas, rosa mucosas y verde afelpadas (Figura 6).

El género predominante en el suelo de cultivo de cacahuate criollo fue *Rhizopus*, seguido de las otras especies descritas y en menor proporción hongos de la sección *A. flavi* (Tabla 9). Sin embargo, no se detectó la posible presencia de *A. flavus* o *A. parasiticus*.

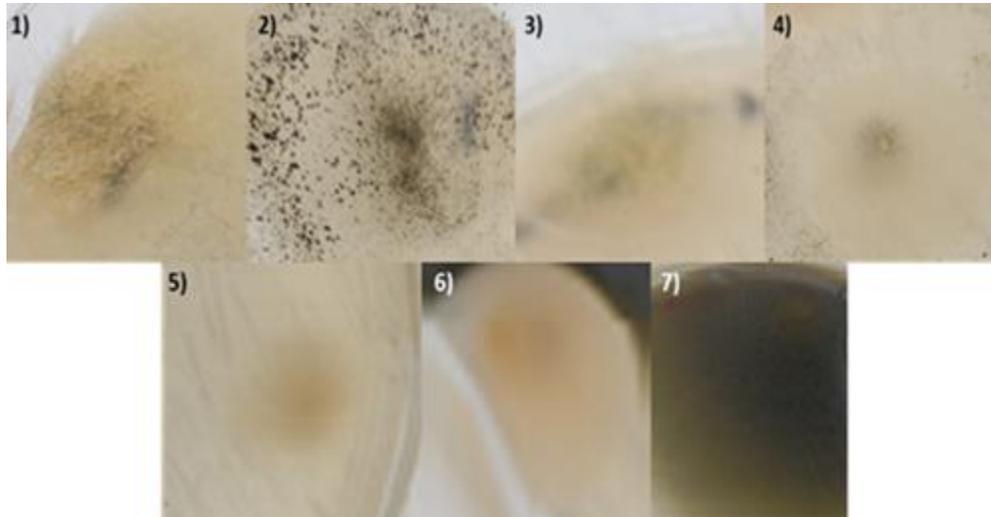


Figura 6. Población fúngica en el suelo de cultivo de cacahuate criollo.

La morfología colonial fúngica observada fue la siguiente: 1) amarillo granulosa (sección *A. flavi*), 2) filamentosa con puntas negras (*Rhizopus*) y otras especies: 3) amarillo polvosa, 4) gris polvosa, 5) gris algodonosa, 6) rosa mucosa y 7) verde afelpada.

Tabla 9. Población fúngica de la sección *A. flavi*, *A. nigri* y otras especies aisladas del suelo de cultivo de cacahuate criollo

UFC* totales g ⁻¹ de suelo	Sección					
	<i>A. flavi</i>	<i>A. nigri</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i>	Otras especies
	UFC g ⁻¹ de suelo					
7.33 x 10 ⁷	9.1 x 10 ⁴	0	0	0	7.3 x 10 ⁷	4.5 x 10 ⁵
Frecuencia relativa (%)	(100)	(0.12)	0	0	(99.27)	(0.61)

*Unidades formadoras de colonia. Los valores representan la media de 2 repeticiones.

b) Población fúngica en cáscara de cacahuate criollo de Tehuiztzingo

En cáscara de cacahuate recién cosechado y almacenado en diferentes condiciones se observó una mayor presencia de hongos con morfologías del género *Mucor*, caracterizado por formar colonias blancas o grises filamentosas, con una frecuencia relativa de 83.41%, seguido por otras especies con menor frecuencia relativa (13.04%), caracterizadas por formar colonias con aspecto café algodonoso, verde afelpado, gris o marrón polvoso. *Rhizopus* presentó una frecuencia relativa menor (2.61%), siendo los hongos de la sección *A. flavi* los que se presentaron con menor frecuencia relativa (0.93%) (Tabla 10). Estos resultados son interesantes e

inesperados, debido a que el cacahuete estuvo almacenado en diferentes periodos de tiempo. Sin embargo, los hongos característicos de almacén, como los de la sección *A. flavi* se encontraron en menor frecuencia relativa. Lo anterior sugiere que las condiciones favorecieron el crecimiento de *Mucor*, pero no el de los hongos de la sección *A. flavi*. Sólo en cáscara de cacahuete almacenado por 14 meses en sacos se encontraron colonias verde granulosas, características de hongos de la sección *A. flavi* (Figura 7).

Tabla 10. Población fúngica de la sección *Aspergillus flavi*, *A. nigri* y otras especies en cáscara de cacahuete criollo recién cosechado y almacenado en diferentes condiciones y tiempos

Condiciones del grano	Tiempo de almacenamiento (meses)	UFC* totales g ⁻¹ cáscara	Sección					
			<i>A. flavi</i>	<i>A. nigri</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i>	Otras especies
UFC g⁻¹ de cáscara								
Recién cosechado	0	2.6 x 10 ⁷	0	0	0	1.4 x 10 ⁷	1.5 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁷
En sacos	5	2.5 x 10 ⁶	0	0	0	2.7 x 10 ⁵	9.1 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁶
	14	7.4 x 10 ⁶	9.1 x 10 ⁵	0	0	5.5 x 10 ⁶	9.1 x 10 ⁵	9.1 x 10 ⁴
A granel	11	6.2 x 10 ⁷	0	0	0	6.2 x 10 ⁷	9.1 x 10 ⁴	1.8 x 10 ⁵
Media		2.4 x 10 ⁷	2.3 x 10 ⁵	0	0	2.0 x 10 ⁷	6.4 x 10 ⁵	3.2 x 10 ⁶
Frecuencia relativa (%)		100	0.93	0	0	83.41	2.61	13.04

*Unidades formadoras de colonia. Los valores representan la media de 2 repeticiones.

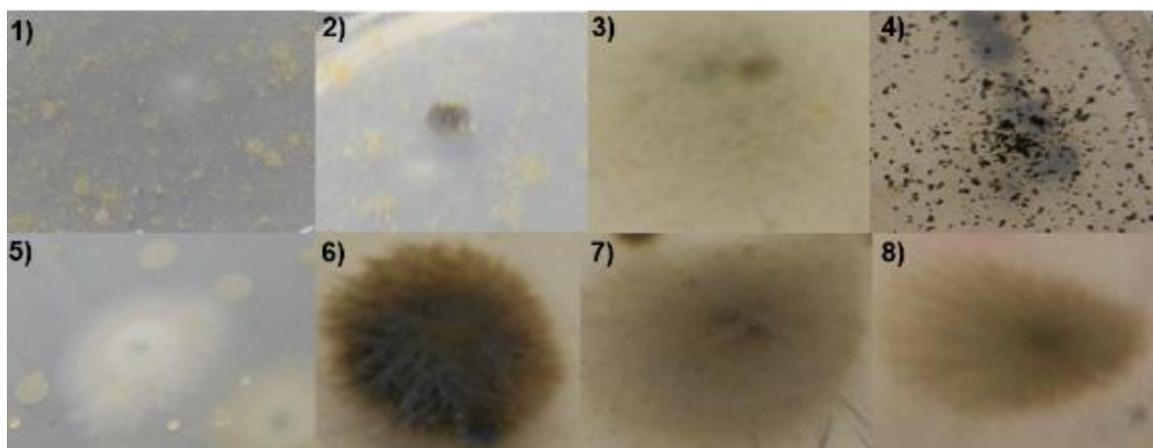


Figura 7. Población fúngica en cáscara de cacahuete criollo.

La morfología colonial fúngica observada fue la siguiente: 1 y 2) hongos de la sección *A. flavi*, 3) *Mucor*, 4) *Rhizopus*, 5-8) otras especies.

c) Población fúngica en granos de cacahuate criollo

En granos de cacahuate criollo de Tehuiztzingo recién cosechado y almacenado durante 5, 11 y 14 meses, respectivamente, la incidencia fúngica fue del 100%. Los principales géneros de hongos presentes en los granos fueron los siguientes: *Rhizopus*; *A. nigri*, caracterizado por formar colonias negras granulosas; *A. flavi*, que forma colonias amarillas, verde amarillentas, verde olivo o café granulosas; *Fusarium*, de colonias blancas algodonosas, y *Mucor*, formador de colonias blancas filamentosas (Figura 8).

Las frecuencias de los hongos de la sección *A. flavi* variaron según el tiempo de almacenamiento. El cacahuate recién cosechado presentó 3% de hongos de esta sección, mientras que los granos almacenados durante 5 meses en sacos presentaron 62%, lo cual pudo deberse a que las condiciones ambientales fueron más favorables para su reproducción durante ese tiempo de almacenamiento. En tiempos de almacenamiento más largos, de 11 y 14 meses, respectivamente, la frecuencia se redujo a 14 y 30% para *A. flavi*, pero fue mayor para *A. nigri* y *Rhizopus* (64 y 97%, respectivamente). En el cacahuate almacenado a granel durante 11 meses, la frecuencia de hongos de la sección *A. flavi* fue mayor (26%) lo cual representa un 12% más que el almacenado 11 meses en sacos (Tabla 11).

También se observó que, en los diferentes tiempos de almacenamiento, cuando el porcentaje de los hongos del género *Rhizopus* y de la sección *A. nigri* eran mayores, el porcentaje de hongos de la sección *A. flavi* fue menor. Cuando *Rhizopus* no estaba presente en granos de cacahuate almacenados en sacos durante 5 meses, la frecuencia de *A. flavi* fue mayor (62%) (Tabla 11).

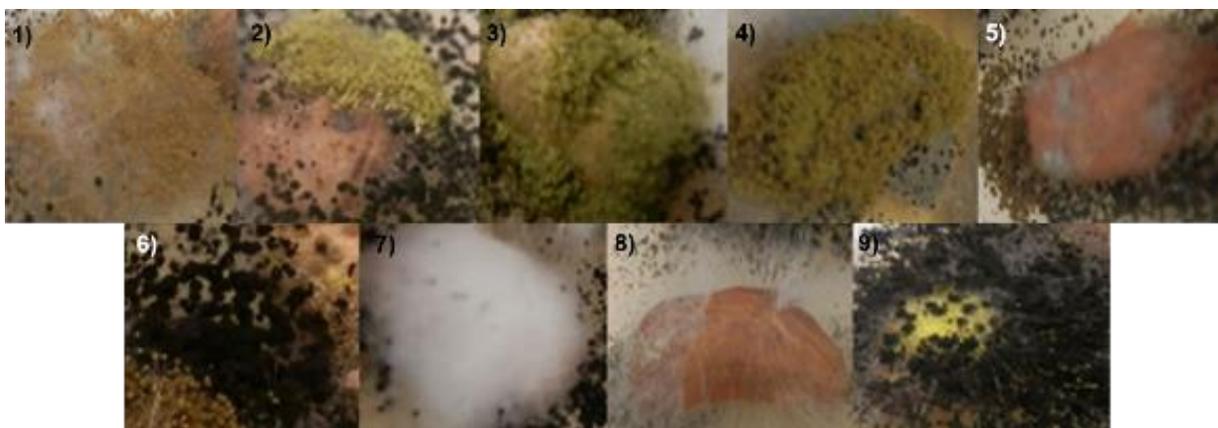


Figura 8. Población fúngica presente en granos de cacahuate criollo.

La morfología colonial fúngica observada fue la siguiente:1-5) hongos del grupo *A. flavi*. 6) hongo de la sección *A. nigri*, 7) *Fusarium*, 8) *Mucor* y 9) *Rhizopus*.

Tabla 11. Frecuencia (%) de hongos de la sección *Aspergillus flavi*, *A. nigri* y otras especies en cacahuate criollo en diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento

Condiciones del grano	Tiempo de almacenamiento (meses)	Cacahuates contaminados %	No. de cepas*	Sección				
				<i>A. flavi</i>	<i>A. nigri</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i>
Recién cosechado	0	100	2	3	0	0	0	100
	5	100	6	62	52	38	0	0
En sacos	11	100	9	14	64	5	0	50
	14	100	14	30	12	8	0	97
A granel	11	100	18	26	100	6	1	34
Media		100.0	10	27.0	45.6	11.4	0.2	56.2

*De un total de 100 granos de cacahuate de cada tipo de almacenamiento por duplicado.

6.5.2 Identificación macro y microscópica de los aislados fúngicos pertenecientes al grupo *A. flavus*

Se obtuvieron 15 aislados con características del grupo *A. flavus*. Uno proveniente de cacahuate recién cosechado, 2 y 7 aislados de cacahuate almacenado en sacos durante 5 y 14 meses, respectivamente, y 5 aislados de cacahuate almacenado a granel durante 11 meses (Tabla 12). Éstos se identificaron con numeración

consecutiva. Su descripción macro y microscópica se encuentra documentada en el Apéndice 2.

Tabla 12. Identificación microscópica de los aislados fúngicos de la sección *A. flavi* de granos de cacahuate criollo en diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento

Condiciones del grano	Tiempo de almacenamiento (meses)	No. de aislados de la sección <i>A. flavi</i>	Posibles especies de <i>Aspergillus</i>	No. de aislados*
Recién cosechado	0	1	<i>A. oryzae</i>	(1)
	5	2	<i>A. arachidicola</i> <i>Aspergillus</i> sp.	(1) (1)
Sacos	14	6	<i>A. arachidicola</i> <i>A. flavus</i>	(3) (3)
		1 (cáscara)	<i>A. arachidicola</i>	(1)
Granel	11	5	<i>Aspergillus</i> sp.	(3)
			<i>A. flavus</i>	(1)
			<i>A. arachidicola</i>	(1)

*El aislamiento se realizó por duplicado.

6.5.3 Determinación del nivel de aflatoxinas en granos de cacahuate almacenados en sacos y a granel

Método 1: Extracción con cloroformo

Los extractos clorofórmicos obtenidos de cacahuate criollo almacenados 5 meses, en sacos, y 11 meses, a granel, fueron evaluados por TLC y HPLC. El uso de TLC, para el análisis de los extractos de las muestras dio resultados negativos (Figura 9). Sin embargo, los mismos extractos al ser analizados por HPLC fueron positivos (Tabla 13). La cantidad de AFB₁ en estos extractos fue muy bajo (0.48 y 2.20 µg kg⁻¹) y no sobrepasó el límite máximo permisible que establece la Norma Oficial Mexicana (NOM-247-SSA1-2008) de 20 µg kg⁻¹ de aflatoxinas en granos o cereales. Esta diferencia en resultados fue muy posiblemente debida a la sensibilidad del método, que es de 0.4 ng/ 20 µL, lo cual permitió la detección de bajas cantidades de AFB₁ (la curva de calibración se muestra en el Apéndice 3).

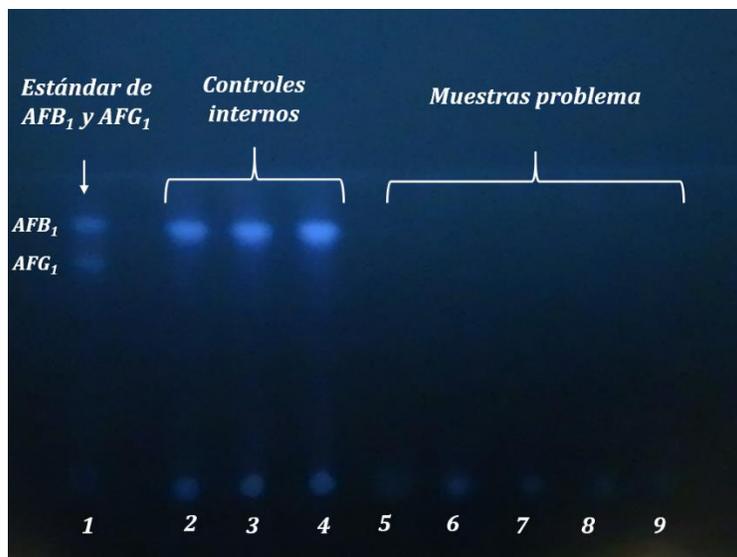


Figura 9. Cromatograma de capa fina de los extractos de muestras de cacahuete criollo obtenidos por el método 1.

Estándar de AFB₁ y AFG₁ en carril 1. Controles internos: se refiere a las muestras de cacahuete adicionadas con cantidad conocida de AFB₁ (carriles 2-4). Muestras problema son muestras de cacahuates sin adición de estándar de AFB₁ (carriles 5-9). La ausencia de fluorescencia azul indica ausencia de AFB₁.

Método 2: Extracción con Metanol: Agua

El nivel de AFB₁ de las muestras de cacahuete criollo almacenado 11 meses en sacos fue determinado mediante el método 2 (Método oficial AOAC 993.17). El nivel de AFB₁ en cacahuete almacenado en sacos durante 11 meses fue de 0.28 µg kg⁻¹ de cacahuete, lo cual no sobrepasa el límite máximo permisible que establece la NOM-247-SSA1-2008 (Tabla 13).

Método 3: Extracción con Metanol: Agua

Con la finalidad de mejorar la eficiencia del método anterior se empleó el método 3 (Método AOAC 993.17 adaptado por Guzmán-de-Peña *et al.*, Comunicación personal). Mediante el cual, se pudo confirmar que el nivel de AFB₁ en las muestras de cacahuete criollo almacenadas 11 meses en sacos tampoco rebasó el límite máximo permisible de aflatoxinas en granos que establece la NOM-247-SSA1-2008 (Tabla 13).

En los extractos de cacahuates almacenados durante 11 meses en sacos aplicados en placa de TLC, no se observó fluorescencia al ser observadas bajo luz UV, lo cual

se debió posiblemente a la baja concentración de AFB₁ presente en estas muestras de cacahuate (Figura 10).

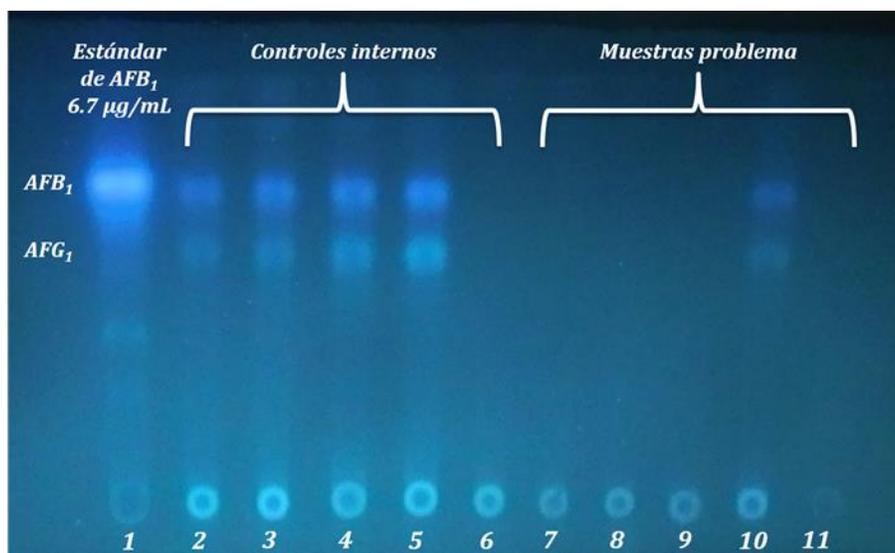


Figura 10. Cromatograma de capa fina de los extractos obtenidos de muestras de cacahuate criollo almacenado 11 meses en sacos por el método 3.

Se muestra el estándar de AFB₁ en carril 1, los “Controles internos” correspondientes a las muestras de cacahuate adicionadas con cantidad conocida de AFB₁ (carriles 2-6). Las “Muestras problema” son muestras de cacahuates sin adición de estándar de AFB₁ (carriles 7-11). La ausencia de fluorescencia azul indica ausencia de AFB₁.

Tabla 13. Nivel de AFB₁ en cacahuate criollo almacenado en sacos y a granel

Método de extracción	Condiciones de almacenamiento	Nivel de AFB ₁ detectado*	
		µg muestra ^{-1**}	µg kg ⁻¹ cacahuate**
1	En sacos 5 meses	0.009 ± 0.002	0.48 ± 0.05
1	A granel 11 meses	0.04 ± 0.01	2.20 ± 0.18
2	En sacos 11 meses	0.007 ± 0.00	0.28 ± 0.13
3		0.012 ± 0.01	0.48 ± 0.19

*Cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución. Nivel de detección 0.4 ng/20 µL.

**Los valores representan la Media ± SD (n=5). El cálculo de SD se realizó con los datos transformados de Log (1+x).

6.5.4 Determinación de la capacidad micotoxigénica de los hongos de la sección *A. flavi* por el método presuntivo

Después de 3 días de incubación, se realizó la lectura de las cajas con medio CAM inoculadas con *Aspergillus* aislados de granos de cacahuate criollo de Tehuiztzingo.

A partir del tercer día se pudo observar que sólo el aislado 3 de cacahuate almacenado a granel (Thz3g) e identificado como *A. arachidicola* mostró fluorescencia azul, así como el control positivo *A. parasiticus* ATCC 16992 (Figura 11). Todos los aislados fúngicos fueron incubados hasta 14 días con la finalidad de asegurar si los aislados presentaban capacidad micotoxigénica. Después de este tiempo, se pudo confirmar que sólo el aislado *A. arachidicola* (Thz3g) era micotoxigénico (Tabla 14).

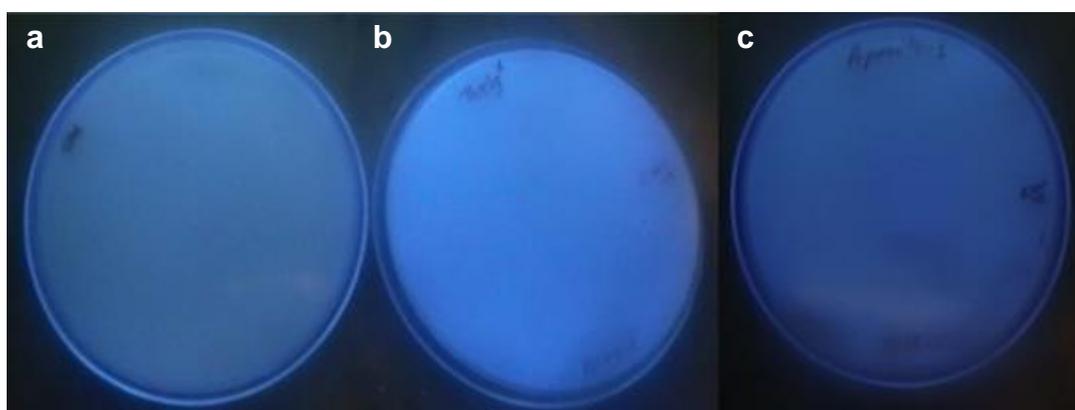


Figura 11. Capacidad micotoxigénica de los aislados evaluada por el método presuntivo en Medio de Coco Agar. Se muestra en: a) control negativo Medio de Coco Agar; en b) *A. arachidicola* (Thz3g), y en c) *A. parasiticus* (control positivo).

Tabla 14. Capacidad micotoxigénica de los hongos de la sección *A. flavi* por el método presuntivo

Posibles especies de <i>Aspergillus</i>	No. de aislados analizados	Fluorescencia*	
		positivo	Negativo
<i>A. parasiticus</i> ATCC 16992	1	1	0
<i>A. arachidicola</i>	6	1	5
<i>Aspergillus</i> sp	4	0	4
<i>A. oryzae</i>	1	0	1
<i>A. flavus</i>	4	0	4

*Medio de Coco Agar, fluorescencia en el reverso del medio.

6.5.5 Producción de aflatoxinas de *A. arachidicola* aislado de cacahuate criollo

Con los extractos obtenidos del medio sólido CAM por el método Keller 2 se realizó TLC mediante la cual se pudo observar la fluorescencia de AFB₁ y AFG₁, cualitativamente la producción de AFB₁ del aislado *A. arachidicola* era superior a la del control positivo *A. parasiticus* ATCC 16992 (Figura 12). Los extractos evaluados en placa de TLC y cuantificados por HPLC demuestran esto último (Tabla 15).

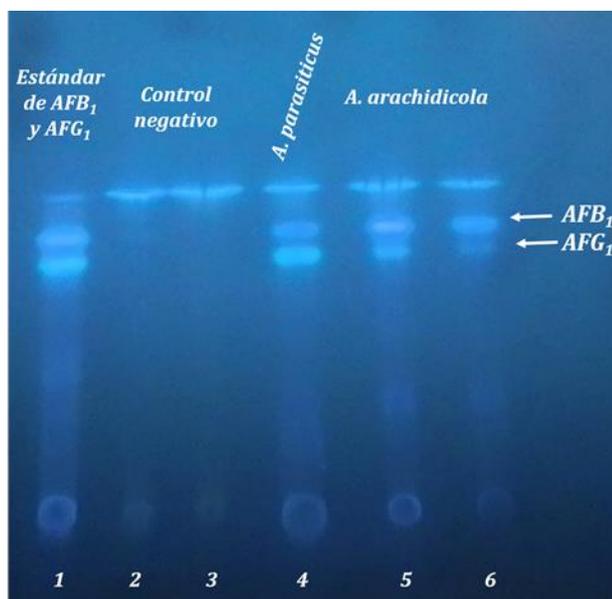


Figura 12. Cromatograma de capa fina de extractos obtenidos de los cultivos de *A. parasiticus* y *A. arachidicola* en medio de coco agar.

Se muestra el estándar de AFB₁ y AFG₁ en el carril 1, el control negativo en carriles 2 y 3, el extracto obtenido de *A. parasiticus* en carril 4 y los extractos obtenidos de *A. arachidicola* en carriles 5 y 6. La fluorescencia azul indica la presencia de aflatoxinas tipo B.

Tabla 15. AFB₁ producida por *A. arachidicola* en medio de coco agar

Cepa /aislado	AFB ₁ µg mL ⁻¹
* <i>A. parasiticus</i> ATCC 16992	44.0
* <i>A. arachidicola</i>	487.6

*Los valores representan la media de 2 repeticiones.

6.6 Ensayos en invernadero

6.6.1 Ensayos de nodulación bajo condiciones de invernadero

Se usaron plantas de cacahuate criollo en dos experimentos establecidos para determinar la capacidad de nodulación de los aislados bacterianos de Tehuiztzingo, las cuales fueron cosechadas a los 60 d después de la siembra (Figura 13). Los aislados Th1 y Th5 fueron los únicos que nodularon raíces de cacahuate, por lo cual se pudo confirmar que estas dos cepas pertenecen al género *Rhizobium*. El aislado Th5 generó mayor número de nódulos. Además, fue el aislado que presentó mayor actividad de nitrogenasa, determinada mediante reducción de acetileno. Al realizar el análisis estadístico, el segundo experimento presentó diferencias significativas (Tabla 16). De igual manera, la biomasa seca aérea fue mayor sólo en las plantas inoculadas con la cepa Th5. El análisis estadístico confirma lo descrito (Gráfica 1).

Tabla 16. Capacidad de nodulación de los aislados bacterianos obtenidos de nódulos de raíz de cacahuate criollo y actividad nitrogenasa en raíces de plantas de cacahuate cultivadas en arena estéril

Planta + aislado bacteriano* (10 ⁹ UFC mL ⁻¹)	Clave	Nodulación		Actividad nitrogenasa** (μmoles de C ₂ H ₄ h ⁻¹ mL ⁻¹)
		Nódulos totales***	Nódulos efectivos (%)	
Ninguno	Control -	0 b	0	27.65 ± 4.69 bc
Aislado 1	Th1	6 ± 1.00 b	100	41.23 ± 0.0 bc
Aislado 2	Th2	0 b	0	71.80 ± 24.60 bc
Aislado 3	Th3	0 b	0	81.38 ± 52.27 bc
Aislado 4	Th4	0 b	0	52.65 ± 26.84 bc
Aislado 5	Th5	38 ± 13.43 a	100	196.92 ± 11.36 a
Aislado 6	Th6	0 b	0	25.91 ± 1.36 c
Aislado 7	Th7	0 b	0	24.99 ± 0.80 c
Ninguno, sólo N y P	FQ	0 b		32.71 ± 0.37 bc

*Aislados bacterianos obtenidos de nódulos de cacahuate criollo de Tehuiztzingo. **Determinada mediante ensayo de reducción de acetileno. Los valores representan la Media ± SD (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Duncan ($P \leq 0.05$).

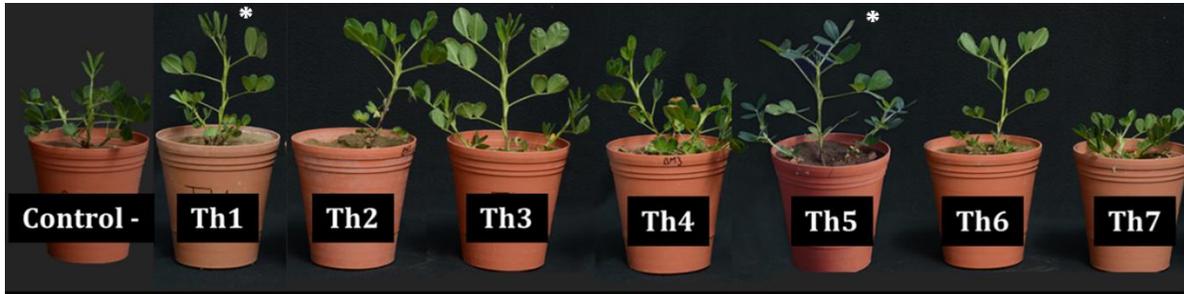
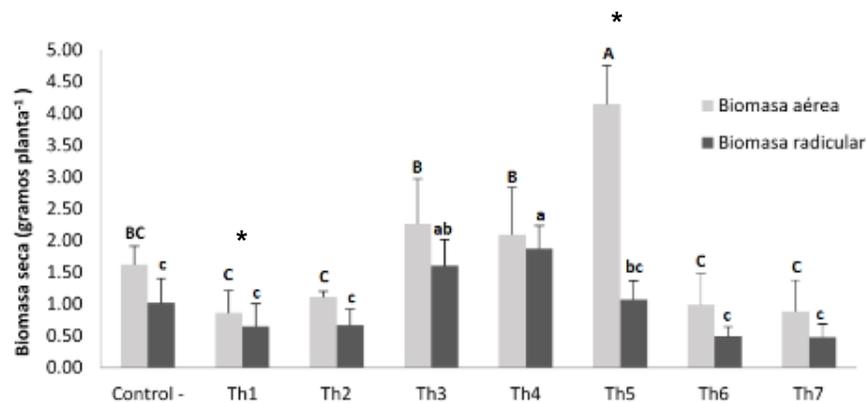


Figura 13. Respuesta a la inoculación con aislados bacterianos obtenidos de nódulos de cacahuete criollo de Tehuitzingo en plantas de cacahuete criollo bajo condiciones de invernadero. Control: planta sin inóculo bacteriano; Th1- Th7: plantas inoculadas con una suspensión bacteriana de 1×10^9 UFC/ maceta. Tres repeticiones/ aislado. *Plantas en donde se encontró presencia de nódulos.



Gráfica 1. Biomasa seca aérea y radicular en plantas de cacahuete inoculadas con *Rhizobium* nativos obtenidos de nódulos de cacahuete criollo en suelo de cultivo de cacahuete de Copalillo, Guanajuato (ensayo 1).

Las barras indican la Media \pm SD (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Duncan ($P \leq 0.05$). Control -: Suelo estéril sin inóculo bacteriano. Th1-7: Inoculación con aislados bacterianos de nódulos de cacahuete criollo de Tehuitzingo. *Plantas en donde se encontró presencia de nódulos.

6.6.2 Efecto de la fertilización química (con N y P) vs. biológica (con *Rhizobium*-hongos micorrícicos arbusculares) sobre la población de hongos aflatoxigénicos en la rizósfera y en la contaminación por aflatoxinas en el cultivo de cacahuete

a) Determinación de la población bacteriana presente en suelo de cultivo a los 45 y 90 días después de la siembra

Las poblaciones bacterianas en general, fueron mayores en los tratamientos inoculados con *Rhizobium* comparadas con aquellas en condiciones naturales a los

45 dds. En contraste, a los 90 dds sólo hubo aumento de la población bacteriana en el suelo donde se inoculó *Rhizobium*, hongos micorrícicos y *A. parasiticus*, mientras que el tratamiento donde se inoculó *A. parasiticus* presentó una menor población bacteriana que los demás tratamientos (Tabla 17).

Tabla 17. Población bacteriana en suelos inoculados con *Rhizobium* y fertilizados químicamente a los 90 días de siembra de plantas de cacahuate

Tratamiento	UFC g ⁻¹ suelo
A. Suelo en condiciones naturales	1.3 x 10 ⁸
B. Suelo + Fertilización Química	1.2 x 10 ⁸
C. Suelo + <i>Rhizobium</i> **	1.2 x 10 ⁸
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	1.8 x 10 ⁷
E. Suelo + Fertilización Química + <i>A. parasiticus</i>	9.1 x 10 ⁸
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	8.1 x 10 ⁸
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	9.6 x 10 ⁸

* Los valores representan la media de 2 repeticiones. **Cepas Th1 y Th5.

b) Determinación de la incidencia fúngica total a los 45 días después de la siembra

La población fúngica en suelo de los tratamientos evaluados en el invernadero, mostró valores variables en cada tratamiento. Las UFC fueron similares en 6 de los 7 tratamientos aplicados al suelo donde se cultivó cacahuate. Sólo en el tratamiento donde se inoculó *A. parasiticus* (D) la población fue mayor (Tabla 18). En condiciones naturales las UFC de los hongos de la sección *A. flavi* y otras especies no identificadas presentaron cantidades similares. Las mayores cantidades de hongos de la sección *A. flavi* se presentaron en el suelo inoculado con *A. parasiticus* y en suelo con *A. parasiticus* y *Rhizobium*. Destaca el hecho de que el tratamiento con fertilización química no presentó hongos de la sección *A. flavi*. De igual manera, en suelo fertilizado químicamente e inoculado con *A. parasiticus*, tampoco se presentaron hongos de la sección *A. flavi* ni de *A. nigri* (Tabla 18).

Tabla 18. Población fúngica de la sección *A. flavi*, *A. nigri* y otras especies en suelo bajo diferentes tratamientos en invernadero a los 45 días después de la siembra de plantas de cacahuete

Tratamiento	UFC totales g ⁻¹ suelo	Sección				Otras especies
		<i>A. flavi</i>	<i>A. nigri</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i>	
A. Suelo en condiciones naturales	1.8 x 10 ⁶	9.1 x 10 ⁵	0	0	0	9.1 x 10 ⁵
B. Suelo + Fertilización Química (FQ)	2.7 x 10 ⁵	0	9.1 x 10 ⁴	0	9.1 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴
C. Suelo + <i>Rhizobium</i> **	1.8 x 10 ⁶	0	0	9.1 x 10 ⁴	0	1.7 x 10 ⁶
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	1.8 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷	0	9.1 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁶
E. Suelo + FQ + <i>A. parasiticus</i>	1.0 x 10 ⁶	0	0	8.2 x 10 ⁵	9.1 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	9.5 x 10 ⁶	9.2 x 10 ⁶	0	9.1 x 10 ⁴	0	2.7 x 10 ⁵
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	5.5 x 10 ⁵	0	9.1 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴	2.7 x 10 ⁵

*Los valores representan la media de 2 repeticiones. **Cepas Th1 y Th5.

Flora fúngica con características pertenecientes a la sección *A. flavi* (45 dds)

Las colonias fúngicas con características de la sección *A. flavi* se identificaron microscópicamente, encontrándose principalmente la especie *A. arachidicola* en el suelo en condiciones naturales. Esta especie de *Aspergillus* también se aisló en suelo inoculado con *Rhizobium* y *A. parasiticus*, mientras que en el suelo inoculado con *A. parasiticus* sólo se identificó *Aspergillus* sp. (Figura 14).



Figura 14. Se muestra en: a) *Aspergillus arachidicola* aislado de suelo de Tehuiztzingo en condiciones naturales, y en b) *Aspergillus* sp. aislado de suelo de Tehuiztzingo inoculado con *A. parasiticus* en invernadero.

c) Determinación de la incidencia fúngica total a los 90 días después de la siembra de cacahuate en invernadero con diferentes tratamientos

Las poblaciones fúngicas aisladas 90 dds fueron en su mayoría del grupo *A. flavi* y *Mucor* (Tabla 19). Solamente el tratamiento de suelo inoculado con *A. parasiticus* no presentó hongos de la sección *flavi*. Inclusive, no se recuperó el hongo inoculado. En los restantes tratamientos las poblaciones encontradas de hongos de la sección *flavi* fueron en menor número (9.1×10^4 hasta 2.7×10^5 UFC g^{-1} suelo) (Tabla 19).

Tabla 19. Población fúngica de la sección *A. flavi*, *A. nigri* y otras especies en suelo bajo 7 tratamientos en invernadero, a los 90 días después de la siembra de cacahuate

Tratamiento	UFC totales g^{-1} suelo	Sección				Otras especies
		<i>A. flavi</i>	<i>A. nigri</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizopus</i>	
A. Suelo en condiciones naturales	2.1×10^6	1.8×10^5	0	1.6×10^6	0	2.7×10^5
B. Suelo + Fertilización Química (FQ)	4.5×10^5	9.1×10^4	0	1.8×10^5	0	1.8×10^5
C. Suelo + <i>Rhizobium</i> **	6.4×10^5	2.7×10^5	0	9.1×10^4	0	2.7×10^5
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	8.2×10^5	0	0	4.5×10^5	0	3.6×10^5
E. Suelo + FQ + <i>A. parasiticus</i>	5.5×10^5	9.1×10^4	0	9.1×10^4	0	3.6×10^5
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	4.5×10^5	9.1×10^4	9.1×10^4	9.1×10^4	0	1.8×10^5
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	8.2×10^5	1.8×10^5	9.1×10^4	9.1×10^4	9.1×10^4	3.6×10^5

*Los valores representan la media de 2 repeticiones. **Cepas Th1 y Th5.

Flora fúngica con características pertenecientes a la sección *A. flavi* (90 dds)

Los hongos aislados del suelo fertilizado químicamente (tratamiento B) y del fertilizado químicamente e inoculado con *A. parasiticus* (tratamiento E) se identificaron macro y microscópicamente como: *Aspergillus* sp., *A. arachidicola* y *A. flavus* (Figuras 14 y 15).

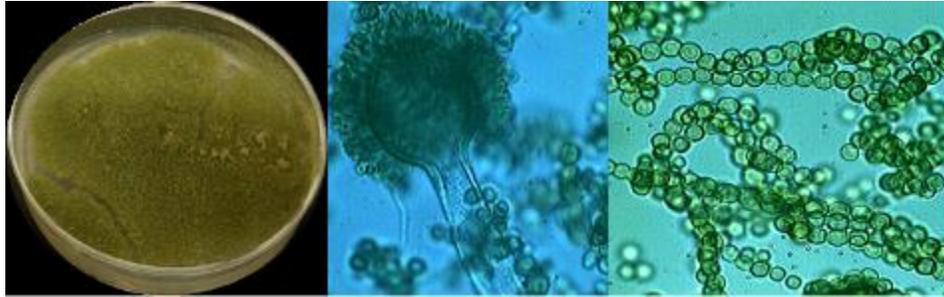


Figura 15. *Aspergillus flavus* aislado de suelo de Tehuiztzingo fertilizado químicamente.

La descripción morfológica macro y microscópica de todos los aislados se encuentra descrita en el Apéndice 4 y 5.

d) Efecto de la fertilización química vs fertilización biológica en el cultivo de cacahuate criollo en invernadero

Las plantas de cacahuate sometidas a los tratamientos de fertilización química en ausencia (B) y presencia de *A. parasiticus* (E) fueron noduladas con *Rhizobium* presentes en el suelo de cultivo de Tehuiztzingo. La mayor actividad nitrogenasa de los nódulos fue la del tratamiento E (Tabla 20). A su vez, las plantas con los tratamientos de fertilización biológica, suelo con *Rhizobium* Th1 y Th5 (C); *Rhizobium* y *A. parasiticus* (F); y *Rhizobium* + hongos micorrícicos y *A. parasiticus* (G) presentaron nódulos en diferentes proporciones con una actividad nitrogenasa baja (Tabla 20).

El mayor número de nódulos y absorción de N lo presentaron las plantas sembradas en suelo sin ningún tratamiento (A), mientras que el menor porcentaje de nódulos efectivos, menor actividad nitrogenasa y absorción de N lo presentaron las plantas del tratamiento inoculado con *A. parasiticus* (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto de la fertilización química vs fertilización biológica en el número de nódulos totales y efectivos, y en la actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de cacahuete

Tratamiento	Nodulación		Actividad nitrogenasa* ($\mu\text{M de C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}$ nódulos h^{-1})**	mg N planta ⁻¹
	Nódulos totales**	Nódulos efectivos %		
A. Suelo en condiciones naturales	127 ± 33 a	96.67 ± 0.00 a	57.17 ± 37.02 a	511.07 ± 99.18 a
B. Suelo + Fertilización Química	93 ± 26 a	92.22 ± 4.01 a	92.90 ± 53.14 a	431.94 ± 146.43 a
C. Suelo + <i>Rhizobium</i>***	80 ± 27 a	95.56 ± 1.11 a	90.92 ± 39.22 a	324.13 ± 38.39 a
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	81 ± 41 a	65.56 ± 32.79 a	36.61 ± 4.43 a	311.48 ± 195.54 a
E. Suelo + Fertilización Química + <i>A. parasiticus</i>	95 ± 28 a	86.67 ± 7.70 a	119.63 ± 23.95 a	442.85 ± 162.33 a
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	124 ± 14 a	81.11 ± 4.84 a	60.33 ± 18.18 a	369.59 ± 64.21 a
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	76 ± 24 a	93.33 ± 3.85 a	54.59 ± 4.43 a	352.12 ± 41.24 a

*Determinada mediante ensayo de reducción de acetileno. **Los valores representan la Media ± SD (n=3). Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes. Duncan ($P \leq 0.05$). ***Cepas Th1 y Th5

Con respecto a la floración, ésta ocurrió primeramente en las plantas con la fertilización Biológica (tratamientos C y F), seguidos por el Control (A) y las plantas fertilizadas químicamente (B) (Figura 16). La evaluación del área foliar, peso seco aéreo y radicular de las plantas con los dos tipos de fertilización fueron similares entre tratamientos a los 120 dds. En los datos de biomasa no se encontraron diferencias significativas (Figura 17, Gráfica 2).

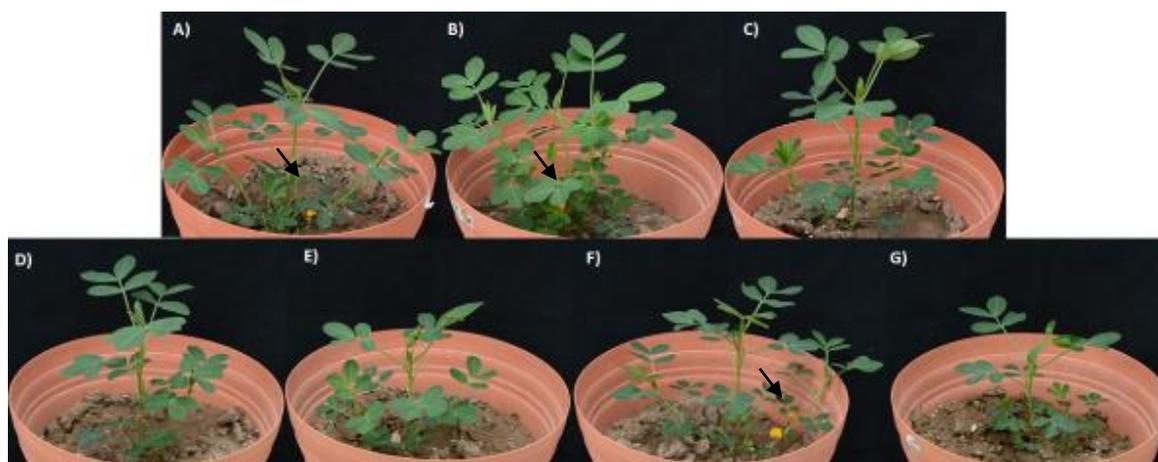


Figura 16. Floración de las plantas de cacahuete criollo 45 días después de la siembra. Los tratamientos aplicados fueron: A) Suelo en condiciones naturales, B) Fertilización química (N: P), C) Inoculación con *Rhizobium*, D) Inoculación con *A. parasiticus*, E) Fertilización química + *A. parasiticus*, F) *Rhizobium* + *A. parasiticus* y G) *Rhizobium* + HMA + *A. parasiticus*.

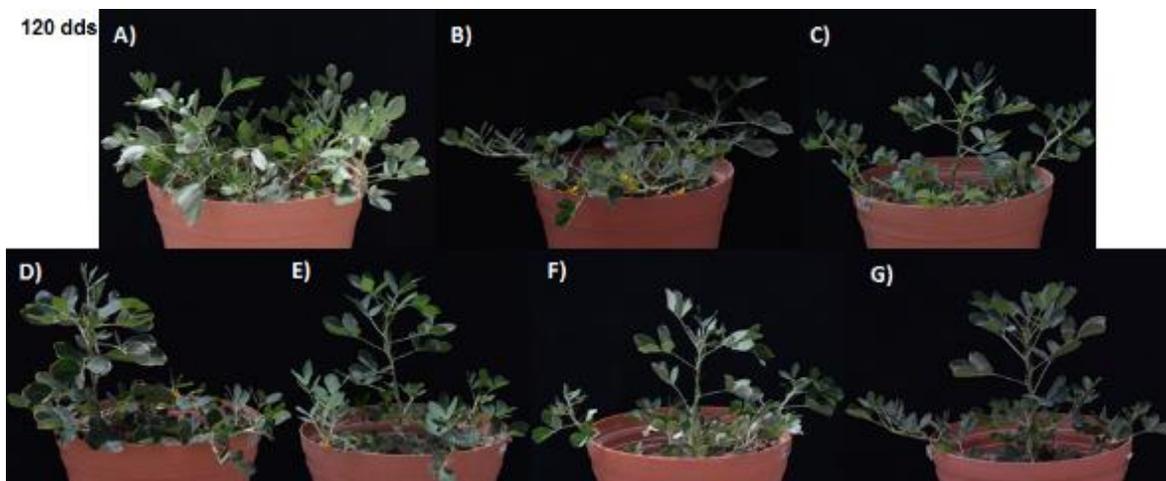
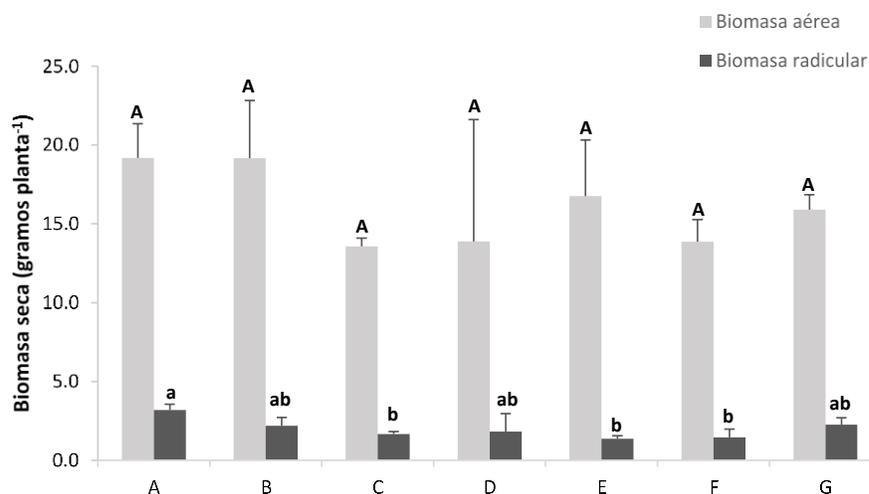


Figura 17. Aspecto de las plantas de cacahuate criollo a los 120 días después de la siembra. Los tratamientos aplicados fueron: A) Suelo en condiciones naturales, B) Fertilización química (N: P), C) Inoculación con *Rhizobium*, D) Inoculación con *A. parasiticus*, E) Fertilización química + *A. parasiticus*, F) *Rhizobium* + *A. parasiticus* y G) *Rhizobium* + HMA + *A. parasiticus*.



Gráfica 2. Biomasa seca aérea y radicular en plantas de cacahuate criollo del ensayo (FQ vs. FB) de fertilización química vs. fertilización biológica (160 dds) cultivadas en suelo de cultivo de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero.

Las barras indican la Media \pm Error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Duncan ($P \leq 0.05$). A) Suelo en condiciones naturales; B) Fertilización química (N y P); C) Inoculación con *Rhizobium*; D) Inoculación con *A. parasiticus*; E) Fertilización química + *A. parasiticus*; F) *Rhizobium* + *A. parasiticus* y G) *Rhizobium* + HMA + *A. parasiticus*.

La absorción de fósforo en las plantas de cacahuate se vio favorecida tanto por la fertilización química (B y E) como por la inoculación de *Rhizobium* junto con hongos micorrícicos (G), principalmente en la parte aérea. Mientras que en raíz sólo se mejoró la absorción en el tratamiento con inóculo de *Rhizobium* (Tabla 21).

Tabla 21. Absorción de fósforo en plantas de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero y cultivadas en suelo de Tehuiztingo con diferentes tratamientos

Tratamiento	ppm de P		
	Parte aérea	Raíz	Planta completa
A. Suelo en condiciones naturales	9.7 ± 0.2 b	10.1 ± 2.1 bc	19.8 ± 2.0 c
B. Suelo + Fertilización Química	12.7 ± 0.2 a	9.6 ± 0.3 bc	22.3 ± 0.1 b
C. Suelo + <i>Rhizobium</i>**	9.7 ± 1.5 b	13.0 ± 0.3 a	22.7 ± 1.8 b
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	9.2 ± 0.1 b	11.1 ± 0.3 b	20.3 ± 0.2 c
E. Suelo + Fertilización Química + <i>A. parasiticus</i>	13.7 ± 0.2 a	11.1 ± 0.5 b	24.8 ± 0.6 a
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	10.0 ± 0.3 b	8.9 ± 0.3 c	18.9 ± 0.6 c
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	12.8 ± 0.3 a	10.1 ± 0.2 bc	22.9 ± 0.2 b

*Los valores representan la Media ± SD (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Duncan ($P \leq 0.05$). **Cepas Th1 y Th5.

Con respecto al rendimiento de grano, los tratamientos inoculados con *Rhizobium* (C y F) presentaron mayor producción de grano, aunque comparativamente, dichos valores no mostraron diferencia estadística significativa (Tabla 22). Como se puede observar en la tabla 22, el menor rendimiento ocurrió en el suelo inoculado con *A. parasiticus* (D).

Tabla 22. Producción de granos de cacahuate por tratamiento en ensayo de invernadero: fertilización química (FQ) vs. fertilización biológica (FB)

Tratamiento	Granos	
	(No. planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)
A. Suelo en condiciones naturales	10 ± 4.8 ab	2.3 ± 1.2 c
B. Suelo + Fertilización Química	12 ± 4.1 ab	3.6 ± 1.3 abc
C. Suelo + <i>Rhizobium</i>**	13 ± 1.2 ab	5.8 ± 0.5 ab
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	4 ± 3.0 b	1.4 ± 1.0 c
E. Suelo + Fertilización Química + <i>A. parasiticus</i>	9 ± 2.0 ab	2.9 ± 0.6 bc
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	16 ± 1.8 a	6.3 ± 0.7 a
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	9 ± 3.5 ab	2.7 ± 1.0 bc

*Los valores representan la Media ± Error estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Duncan ($P \leq 0.05$). **Cepas Th1 y Th5.

e) Porcentaje de colonización de micorrizas en raíces

Las raíces de las plantas inoculadas con hongos micorrícicos (G) fueron teñidas y evaluadas por microscopía, se observó la presencia de vesículas arbusculares, lo cual indica que hubo colonización del consorcio micorrícico inoculado. El porcentaje

de micorrización en este tratamiento fue del 30%, mientras que en las raíces de plantas en suelo en condiciones naturales no hubo micorrización (Figura 18).

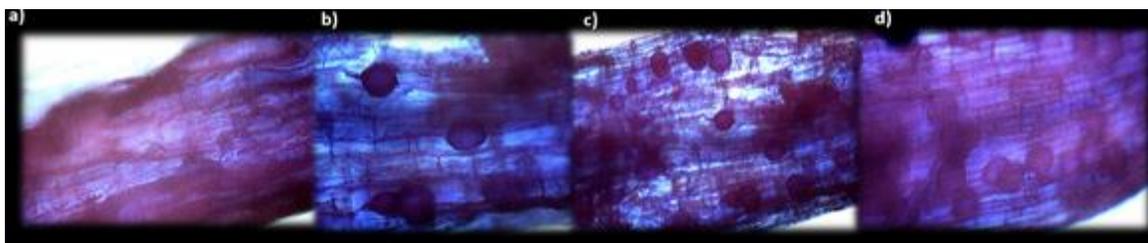


Figura 18. Colonización del consorcio micorrícico en raíces de cacahuate criollo.

Se muestra en: a) raíces de Suelo control (Condiciones naturales) sin micorrización; en b, c y d) raíces con presencia de vesículas arbusculares en tratamiento G) Suelo + *Rhizobium* + HMA + *A. parasiticus*.

f) Nivel de aflatoxinas en granos de cacahuate del ensayo de invernadero

Los cacahuates producidos en los diferentes tratamientos no presentaron contaminación con AFB₁, aún en presencia de hongos de la sección *A. flavi* ya que estos hongos fueron aislados del suelo de los tratamientos, con excepción de los granos producidos en el tratamiento E (suelo inoculado con 1×10^6 esporas mL⁻¹ de *A. parasiticus* y fertilizado químicamente). El nivel de AFB₁ fue de 23.28 ng g⁻¹ cacahuate, equivalentes a 23.28 µg AFB₁ kg⁻¹ cacahuate. Este nivel de contaminación está ligeramente por encima del valor máximo permisible (20 µg AFB₁ kg⁻¹) establecido por la norma oficial mexicana (NOM-247-SSA1-2008). Un dato importante a considerar es que en los granos producidos en suelos inoculados con *A. parasiticus* (1×10^6 esporas mL⁻¹), *Rhizobium* y hongos micorrícicos, no se detectó AFB₁ (Tabla 23).

Tabla 23. Nivel de AFB₁ en granos de cacahuate del ensayo de invernadero FQ vs FB

Tratamiento	Nivel de AFB ₁ detectado* µg AFB ₁ kg ⁻¹ cacahuate**
A. Suelo en condiciones naturales	0
B. Suelo + Fertilización Química	0
C. Suelo + <i>Rhizobium</i> ***	0
D. Suelo + <i>A. parasiticus</i>	0
E. Suelo + Fertilización Química + <i>A. parasiticus</i>	23.28 ± 1.07
F. Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	0
G. Suelo + <i>Rhizobium</i> + HMA + <i>A. parasiticus</i>	0

*Cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución. Nivel de detección 0.4 ng/20 µL. **Los valores representan la Media ± SD (n=3). El cálculo de SD se realizó con los datos transformados de Log (1+x). ***Cepas Th1 y Th5.

VII. DISCUSIÓN

No obstante que el grano de la planta de cacahuete representa una fuente de proteína vegetal de vital importancia en la dieta de la población de ciertas comunidades rurales en México, se desconocen aspectos fundamentales sobre su manejo agrícola, *i.e.*, los efectos de la fijación biológica de nitrógeno, la micorrización y de la fertilización con N. Tampoco se conoce la influencia que éstos pudieran tener sobre la incidencia de hongos con capacidad de producción de aflatoxinas, que son compuestos carcinogénicos en humanos.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar el efecto de la fertilización química vs. la biológica sobre la susceptibilidad del cacahuete a la contaminación por hongos aflatoxigénicos. Es importante destacar que la caracterización físico-química del suelo de cultivo de cacahuete de Tehuizingo, Puebla mostró valores bajos en cuanto al contenido de nitrógeno y fósforo, lo que posiblemente repercute en el bajo rendimiento del cultivo de cacahuete en este sitio. Lo anterior debido a que esta planta requiere de una fertilización de N y P de 40-60 kg/ ha en el momento de la siembra o en la primera escarda (Medina *et al.*, 2003). Sin embargo, el bajo estado nutrimental del suelo, podría favorecer la nodulación por *Rhizobium*, ya que se ha demostrado que a dosis de fertilización de N mayores a 80 kg N ha⁻¹ se afecta la nodulación y se inhibe la fijación biológica de N₂ (Leidi & Rodríguez, 2000). El resultado de nodulación de las plantas cultivadas en suelo en condiciones naturales y en ensayos de invernadero, también mantenidas en un estado nutrimental bajo, concordaron con lo descrito por Leidi & Rodríguez (2000), quienes también reportaron mayor nodulación en condiciones muy similares. Igualmente, la fijación biológica de nitrógeno fue mayor en las plantas noduladas de acuerdo a los ensayos de actividad nitrogenasa. En contraste, en el experimento de fertilización química vs. biológica, las plantas con fertilización química presentaron menos nódulos que las plantas fertilizadas biológicamente, mientras que el rendimiento del cultivo se vio favorecido en los tratamientos inoculados con *Rhizobium*.

Se determinó que la mayor fijación de nitrógeno medida como $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}$ nódulos h^{-1} , ocurrió durante la floración de las plantas en presencia de *Rhizobium*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Punos & Iglesias (2005) quienes indican que la mayor tasa de fijación biológica de nitrógeno se produce en las etapas de floración y llenado de granos. El número de nódulos y la actividad nitrogenasa tienden a disminuir después porque la planta destina gran cantidad de hidratos de carbono hacia el llenado de los granos. Esta reasignación de fuentes de carbono desactiva la fijación biológica del nitrógeno, debido a que los nódulos quedan sin fuente de energía, mueren y se desprenden de las raíces.

Los aislados bacterianos Th1 y Th5 (obtenidos de nódulos) mostraron capacidad de nodulación, siendo el aislado Th5 el que más estimuló la nodulación y la actividad nitrogenasa en las raíces de las plantas inoculadas con este aislado. Además, se observó un efecto positivo de Th5 sobre la biomasa aérea de las plantas de cacahuate. Estos resultados muestran que existe una relación entre la actividad de la nitrogenasa, responsable de la fijación biológica de nitrógeno, y el contenido de materia seca en las plantas, tal como lo reportan Hardarson & Danso (1999).

Las bacterias del género *Rhizobium*, además de tener la capacidad de fijar nitrógeno, producen auxinas, *i.e.*, compuestos derivados del ácido indolacético (AIA), sideróforos y además solubilizan fosfatos (Patten & Glick, 1996; Khan *et al.*, 2009; Deshwal *et al.*, 2011). Al respecto, en este estudio los aislados Th1 y Th5 mostraron producción media de auxinas. Sin embargo, Th1 produjo sideróforos y solubilizó fosfatos mientras que Th5 no presentó estas propiedades. Resultados similares han sido reportados por Badawi *et al.* (2011), quienes observaron que cepas de *Bradyrhizobium* no mostraron la capacidad de excretar sideróforos en medio CAS y mostraron baja capacidad para solubilizar fosfatos comparadas con *Serratia marcescens* y *Trichoderma harzianum*.

Con respecto al efecto de la fertilización química vs. la fertilización biológica sobre las características generales del cultivo de cacahuate, no se encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa, ni en el rendimiento. Estos resultados podrían deberse a que el cultivo fue poco sensible a la fertilización aplicada de N y

P, que fue de 10 ppm y 15 ppm, respectivamente. Además, se utilizaron suelos y cultivares originarios de Tehuitzingo, los cuales son de temporal. Resultados similares han sido reportados por Barrera *et al.* (2002), quienes no observaron buenos rendimientos en el cultivo de cacahuate de temporal a diferentes dosis de N, P y K en el estado de Morelos. Asimismo, Martínez (1985) no encontró diferencias significativas en el rendimiento utilizando inoculantes vs. fertilizantes químicos en un ensayo con cacahuate de medio riego en el municipio de Axochiapan, Morelos.

En el presente estudio se observó que la inoculación con *Rhizobium* favoreció la absorción de P y este valor fue mayor al obtenido con fertilización química. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Jia *et al.* (2004), donde plantas de haba (*Vicia faba*) inoculadas con *Rhizobium* mostraron un incremento en la acumulación de P comparado con plantas con bajo suministro de nitrógeno o sin inoculación con *Rhizobium* ni fertilización nitrogenada.

En el presente trabajo se determinó una baja colonización de hongos micorrícicos en el ensayo en invernadero. Esto podría estar relacionado con la deficiencia de N y la presencia de *Rhizobium*. Al respecto, Jia *et al.* (2004) reportaron que en los tratamientos con baja concentración de N (10 ppm) e inoculación de *Rhizobium* se observó una reducción del 50% en la colonización vesicular (VC); mientras que en una alta concentración de N (250 ppm), *Rhizobium* no afectó la VC.

En el suelo de cultivo de cacahuate criollo de Tehuitzingo, la frecuencia relativa de hongos de la sección *A. flavi* fue baja. *A. flavus* y *A. parasiticus* no se aislaron de este suelo. Su ausencia pudo estar relacionada, en primer lugar, a que las condiciones ambientales del sitio son desfavorables para estas especies. *A. flavus* y *A. parasiticus* requieren una temperatura óptima de 28°C; pH de 6.5 - 7.5 y humedad relativa entre 88 y 95% para crecer. Asimismo, la ausencia de estos hongos podría deberse a la competencia entre especies (Alexander, 1971; Widstrom *et al.*, 2003; FAO/OIEA, 2003), como la de *Rhizopus*, que tiene un crecimiento muy rápido y quizás por ello, su frecuencia relativa fue mayor.

En el presente trabajo, la cáscara de cacahuete criollo de Tehuiztingo almacenado por 14 meses, presentó hongos del género *Mucor* en mayor porcentaje con respecto a otras especies, mientras que los hongos de la sección *A. flavi* representaron sólo el 0.93% de la población total. Esto podría indicar que la contaminación por parte de *A. flavi* en cacahuete criollo ocurre durante el almacenamiento, y la incidencia de las poblaciones fúngicas varía con respecto al tiempo. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Nakai *et al.* (2008), quienes en un estudio realizado en cacahuates almacenados y monitoreados mensualmente durante un año encontraron que las frecuencias relativas de las poblaciones variaron de acuerdo al tiempo de muestreo: *Fusarium* spp. presentó una frecuencia relativa de 97.5% en el primer mes y de 45% en el mes 12; en contraste, *Rhizopus* spp. presentó una frecuencia de 2.5% en el primer mes y de 18.75% en el último mes. En este mismo contexto las poblaciones de *Aspergillus* spp. no se detectaron en el primer mes; sin embargo, la frecuencia relativa aumentó a 13.75% en el mes 12.

La población fúngica aislada en el presente estudio coincidió con los resultados obtenidos por otros autores (Bhattacharya & Raha, 2002; Rossetto *et al.*, 2005; Nakai *et al.*, 2008). Es importante destacar que los géneros encontrados son los mismos que los reportados por estos autores en granos de cacahuete de la India y Brasil. La baja frecuencia relativa de *Fusarium* detectada en los granos de cacahuete en este estudio, también se ha observado en otros estudios durante el almacenamiento (Nakai *et al.*, 2008). Estos autores encontraron porcentajes de 43 a 53% de *Fusarium* durante los primeros meses de almacenamiento y después de 1 año, el porcentaje se redujo hasta 6%. Se ha observado un comportamiento similar en granos de maíz en el norte de Tamaulipas, en donde se reportó que el maíz en campo presentó una frecuencia relativa de *Fusarium* del 76.9%, 11.6% de *Penicillium* y 3.1% de *Aspergillus*; mientras que, en almacén las frecuencias cambiaron drásticamente, reduciéndose hasta 5.5% para *Fusarium*, y aumentando a 15.9% y 50.3% para *Penicillium* y *Aspergillus*, respectivamente. Estos datos ilustran claramente que la frecuencia de hongos del grupo *Aspergillus* aumenta durante el almacenamiento (Hernández *et al.*, 2007).

Aunado al comportamiento antes descrito, las poblaciones de *A. flavi* se vieron incrementadas durante el almacenamiento con una marcada diferencia entre las condiciones de almacenamiento a granel y en sacos por 11 meses, las cuales fueron de 26% y 14% respectivamente. Esto indica que aún dentro del almacenamiento deben establecerse condiciones para evitar la contaminación por hongos potencialmente aflatoxigénicos, tal como guardar los granos en sacos, lo cual disminuye la contaminación dentro del mismo almacén. Scussel *et al.* (2008) reportaron que cuando los granos son almacenados a granel son más susceptibles a la contaminación por hongos debido a que las condiciones de humedad y temperatura no pueden controlarse, a diferencia con el almacenamiento bajo suelos, en sacos o silos. Otras condiciones que se utilizan tradicionalmente para proteger a los granos durante el almacenamiento es aplicarles cal o ceniza antes del almacenamiento (Productores de cacahuate de Tehuiztzingo Puebla, Comunicación personal).

A. arachidicola fue el hongo detectado en mayor proporción en granos de cacahuate en este estudio. Estos datos concuerdan con Pildain *et al.* (2008) quienes reportaron a esta especie como un hongo aflatoxigénico aislado de cacahuate. En otras regiones productoras de cacahuate en México, solo se han aislado *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de cacahuate y no hay reportes sobre la presencia de *A. arachidicola* (Angulo, 2009; Durán *et al.*, 2011).

Resulta muy interesante que el aislado de *A. arachidicola* Thz3g, que fue el aislado no. 3 obtenido de cacahuate almacenado a granel durante 11 meses, es capaz de producir aflatoxina B₁ y G₁. Este resultado concordó con lo observado por Pildain *et al.* (2008) quienes reportaron que *A. arachidicola* es productor de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. En contraste, los aislados de *A. flavus* fueron incapaces de producir aflatoxinas *in vitro*, en los medios tradicionales de cultivo utilizados.

El bajo nivel de contaminación de aflatoxinas en los granos de cacahuate criollo de Tehuiztzingo almacenados en sacos y a granel durante 5 y 11 meses, respectivamente, puede explicarse debido a que se demostró que *A. flavus* no produce aflatoxinas.

En el ensayo de invernadero del presente trabajo, en donde se evaluó la fertilización química vs. la fertilización biológica en el cultivo de cacahuate, se pudo determinar que la fertilización química no tuvo efecto sobre las poblaciones fúngicas. Estos resultados contrastan con los descritos por Yu *et al.* (2015), quienes reportaron que la aplicación de fertilizante nitrogenado aumenta las poblaciones fúngicas. Sin embargo, otros autores han observado que la aplicación de N en el cultivo de cebada no altera la biomasa microbiana del suelo (Lupwayi *et al.*, 2012).

En el presente estudio, los hongos de la sección *A. flavi* fueron mayores en el suelo inoculado con *Rhizobium* (tratamiento C) y en el suelo inoculado con *Rhizobium* + HMA + *A. parasiticus* (tratamiento G) en condiciones de invernadero. Los tratamientos influyeron sobre el tipo de especie de hongos de la sección *A. flavi*, ya que en todos los tratamientos se aislaron *A. flavus* o *A. arachidicola*. Es probable que las variaciones en los tratamientos afectan las proporciones de los diferentes grupos, sugiriendo que los cambios en la población están dados por la interrelación entre ellos y la planta. Además, la proporción de hongos puede también estar relacionada con la edad de la planta. Rao (1962) encontró diferencias en el número y especies de las poblaciones fúngicas de la rizósfera de ocho variedades de cacahuate de diferentes edades.

En el presente trabajo se observó una relación inversa entre la abundancia de los géneros *Mucor*, *Rhizopus* y hongos de la sección *A. nigri* y la baja población de hongos de la sección *A. flavi*. Estos resultados concordaron con lo reportado por Riascos *et al.* (2011), quienes indicaron que las poblaciones de *Rhizopus* pueden tener actividad antagónica o saprófita a nivel de rizósfera. Con respecto a la presencia de *A. niger* en suelo, se ha reportado que este hongo compite con *A. flavus* en condiciones de humedad relativa alta de 92 a 99% y temperaturas entre 30 y 40°C (Diener & Davis, 1977). Curiosamente, estas temperaturas fueron las que prevalecieron durante el ensayo bajo condiciones de invernadero y pudieron haber influido en los resultados obtenidos.

Los granos producidos en plantas cultivadas en suelo inoculado con *A. parasiticus* y fertilizado químicamente con N (tratamiento E) presentaron contaminación con

AFB₁. Esto indica que la fertilización química favoreció la contaminación de cacahuete por aflatoxinas. Este resultado contrastó con lo reportado por Tubajika *et al.* (1999) quienes cuantificaron una menor contaminación por aflatoxinas en maíz fertilizado químicamente a un nivel de 11.2 kg ha⁻¹ de N, usando una solución de urea/ nitrato de amonio, al compararlo con el maíz sin fertilización N. Pero coincidieron con lo reportado por Arunyanark *et al.* (2012), quienes observaron que al mantener la fijación biológica de nitrógeno con la inoculación de *Bradyrhizobium* se reduce la contaminación por aflatoxinas en cacahuete.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la fuente de nitrógeno vía microbiológica, es decir mediante la inoculación con *Rhizobium*, puede ser una estrategia para evitar la contaminación por aflatoxinas en cacahuete, considerando que la fertilización química en presencia de hongos aflatoxigénicos favoreció la contaminación con AFB₁.

VIII. CONCLUSIONES

El suelo del cultivo de cacahuate criollo de Tehuiztingo, Puebla presenta bajo *status* nutrimental de nitrógeno y fósforo, lo cual muy posiblemente repercute en el rendimiento del cultivo, pero favorece el establecimiento de *Rhizobium*.

Las condiciones ambientales en campo no favorecieron el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, por lo cual no se aislaron estos hongos del suelo de cultivo de cacahuate criollo.

Los hongos de la sección *A. flavi* se aislaron de granos almacenados durante 5, 11 y 14 meses. También se aisló *A. arachidicola* y se confirmó su capacidad toxigénica.

El nivel de contaminación con AFB₁ fue muy bajo, y no rebasó el límite máximo permisible establecido por la NOM-247-SSA1-2008.

La fertilización química del suelo favoreció la contaminación con aflatoxinas de los granos de cacahuate.

Debido a que las condiciones ambientales en campo de Tehuiztingo, Puebla no son favorables para el desarrollo de *A. flavus* y *A. parasiticus*, la contaminación por hongos aflatoxigénicos en granos de cacahuate criollo se da en condiciones de almacenamiento, siendo más susceptibles a granel. Sin embargo, el nivel de contaminación por AFB₁ no rebasa el límite máximo permisible establecido por la NOM-247-SSA1-2008. Lo cual sugiere que la fertilización biológica en suelos con bajo *status* nutrimental protege al cultivo de cacahuate de la contaminación por aflatoxinas mientras que la fertilización química favorece esta contaminación como se observó en condiciones de invernadero.

IX. PERSPECTIVAS

En el presente estudio se observó que el suelo de Tehuitzingo, Puebla no representa una fuente de *A. flavus* ni *A. parasiticus* debido a que las condiciones ambientales no son favorables para el crecimiento de estos hongos. El cacahuate criollo de Tehuitzingo es más susceptible a la contaminación por hongos aflatoxigénicos en condiciones de almacenamiento. Sin embargo, el nivel de aflatoxinas presente en los granos fue muy bajo comparado con aquellos cacahuates que son producidos empleando fertilización química. Además, la fertilización biológica con *Rhizobium* mejoró el rendimiento de granos de cacahuate criollo, lo cual es de gran importancia para la alimentación y economía de la región productora.

Con base en lo aprendido se plantean las siguientes perspectivas para el presente trabajo:

Analizar la composición de los granos de cacahuate criollo e híbrido para identificar diferencias en la susceptibilidad al ataque por *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Evaluar diferentes dosis y fuentes de fertilización química (N, P, K) para determinar su impacto en el rendimiento del cultivo y en la contaminación por aflatoxinas en grano de cacahuate criollo.

Identificar aislados bacterianos y fúngicos (rizosféricos y de grano) del cultivo de cacahuate criollo con capacidad antagonica de *A. arachidicola* aflatoxigénico.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, H., Wilkinson, J., Zablotowicz, R., Accinelli, C., Abel, C., Bruns, H. y Weaver, M. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28: 142-153.

Alexander, D. B. y Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12: 39-45.

Alexander, M. 1971. *Microbial Ecology*. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc. pp. 283-297.

Angulo, M. 2009. Guía para prevenir las aflatoxinas en cacahuate. *Fundación Produce Sinaloa A. C.* pp. 7-20.

Angulo, J. y Joaquín, I. 2009. Paquete tecnológico para alta productividad de cacahuate. *Fundación Produce Sinaloa A. C.* pp. 7-22.

AOAC, Official Methods of Analysis, 1995. Aflatoxins in corn and peanuts. Thin-layer chromatographic method. pp. 14, 15.

Arunyanark, A., Jogloy, S., Wongkaew, S., Akkasaeng, C., Vorasoot, N., Wright, G., Rachaputi, C. y Patanothai, A. 2009. Association between aflatoxin contamination and drought tolerance traits in peanut. *Field Crops Research*, 114: 14-22.

Arunyanark, A., Pimratch, S., Jogloy, S., Wongkaew, S., Vorasoot, N., Akkasaeng, C., Kesmala, T., Patanothai, A. y Holbrook, C. 2012. Association between aflatoxin contamination and N₂ fixation in peanut under drought conditions. *International Journal of Plant Production*, 6: 161-172.

Asociación Naturland. 2000. *Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico*. 1ª. Edición. pp. 5-8.

Azcón, R., Rubio, R. y Barea, J. 1991. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N₂-fixation (¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist*, 117: 399-404.

Badawi, F., Biomy, A. y Desoky, A. 2011. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Science*, 56: 17-25.

Barrera, A., Díaz, V. y Hernández, L. 2002. Producción del cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) en el estado de Morelos. *Folleto técnico*, 18: 1-16.

Barros, G., Torres, A., Palacio, G. y Chulze, S. 2003. *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1303-1307.

Bhattacharya, K. y Raha, S. 2002. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia*, 155: 135-141.

Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C. y Giordano, W. 2006. Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina. *Annals of Applied Biology*, 148: 207-212.

Bonilla, M. 2005. Estrategias adaptativas de plantas del Páramo y del bosque Alto andino en la cordillera oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. p. 155.

Cary, J., Klich, M. y Beltz, S. 2005. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97: 425-432.

Celis, L. y Gallardo, I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. pp. 13-16.

Clua, A., Olgiati, J. y Beltrano, J. 2013. Evaluación de la doble inoculación *Bradyrhizobium*-micorrizas y el uso de fitoterápicos de semilla en el crecimiento, eficiencia de inoculación y el rendimiento de un cultivo de soja. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39: 250-258.

Corporación Chapingo S.A. de C. V. 2002. Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología Cadena Productiva de Cacahuate. pp.11-15.

Cruz, A. 2013. Estudio de los mecanismos de fitorremediación de *Festuca arundinacea* en interacción con un hongo filamentoso en presencia de hidrocarburos. Tesis de doctorado. UAM Iztapalapa. pp. 41, 42.

Deshwal, V., Babylaisana, N., Kongbrailatpam, B., Swati y Chauhan, A. 2011. Qualitative, Quantitative Analysis of Siderophore Production by *Rhizobium* Strains and Evaluation of the Effect of Iron on Siderophore Production. *The IUP Journal of Life Sciences*, 5: 23-29.

Díaz, C. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de *rhizobia* autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis de doctorado Universidad de León. p. 5.

Diener, U. y Davis, N. 1977. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. Auburn University. Agricultural Experiment Station. *Bulletin*, 493: 4-11.

Durán, A., López, V., Becerra, E., Esqueda, V., Joaquín, I. y Cumpián, J. 2011. Manual de producción del cultivo de cacahuete *Arachis hypogaea* L. en el estado de Veracruz. SAGARPA, INIFAP. pp. 57, 58.

Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D. y Gresshoff, P. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 61-76.

FAO. Ecología y enseñanza rural. El suelo. Febrero 03 2015. De FAO. Sitio web: www.fao.org

FAO/OIEA. 2003. Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Organismo Internacional de Energía Atómica Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 8, 9.

FAOSTAT. 2013. Top production-Groundnuts with Shell. Marzo 28 2015. De FAO. Sitio web: www.faostat.fao.org

Ferrera, R. y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum.*, 8: 180.

García, C., Martínez, R., Rojo, G. y Ramírez, B. 2009. Tecnologías de granos y semillas. Libros Técnicos: Serie Agricultura. p. 35.

González, C. 2012. El papel de la trealosa en la sobrevivencia de las bacterias nodulantes de *Lonchocarpus eriocarinalis* a la desecación del suelo. Tesis de maestría. CINVESTAV IPN. pp. 6-31.

Graham, P. y Vance, C. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877.

Guerra, B. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*, 21: 191-201.

Hardarson, G. y Danso, S. 1999. Métodos para medir la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas de grano. En Peña-Cabriales J.J. y Zapata, F. Aumento

de la Fijación Biológica de Nitrógeno en el Frijol común en América Latina. IMPROSA, México. pp.19-23.

Hedayati, M., Pasqualotto, A., Warn, P., Bowyer, P. y Denning, D. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.

Hell, K., Cardwell, K. y Poehling, H. 2003. Relationship between Management Practices, Fungal Infection and Aflatoxin for Stored Maize in Benin. *The Journal of Phytopathology*, 151: 690-698.

Hernández, S., Reyes, M., García, J. y Mayek, N. 2007. Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25: 127-133.

Hernández, J., Cubillos, J. y Milian, P. 2012. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2: 51-62.

Hernández, L., Munive, J., Sandoval, E., Martínez, D. y Villegas, M. 2013. Efecto de las prácticas agrícolas sobre las poblaciones bacterianas del suelo en sistemas de cultivo en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4: 353-365.

Horn, B. 2005. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97: 202-217.

INIFAP, CP, UACH y UAG. 2005. Guía para cultivar cacahuete de temporal en la cuenca del alto Balsas. *Folleto para productores*, 41: 3-23.

Jia, Y., Gray, V. y Straker, C. 2004. The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany*, 94: 251-258.

Jin, Y., Bok, J., Guzmán-De-Peña, D. y Keller N. 2002. Requirement of spermidine for developmental transitions in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 46: 801-812.

Khan, A., Jilani, G., Akhtar, M., Naqvi, S. y Rasheed, M. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1: 48-58.

Klich, M. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8: 713-722.

Knowles, R. 1982. Free-living Dinitrogen-fixing Bacteria. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties-Agronomy Monograph*. (2nd Edition). Madison, USA. pp. 1071-1092.

Kormanik, P. y Mc Graw, A. 1982. Quantification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae in plant roots. In *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Ed. N. C. Schenck. APC press USA. pp. 37-45.

Leidi, E. y Rodríguez, D. 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytologist*, 147: 337-346.

Lin, M. y Dianese, J. 1976. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* sp. *Phytopatology*, 66: 1466-1469.

Lupwayi, N., Lafond, G., Ziadi, N. y Grant, C. 2012. Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn. *Soil & Tillage Research*, 118: 139-146.

Matos, G., Ormeño, E. y Zúñiga, D. 1998. Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en la costa central del Perú. *Ecología*, 1: 42-46.

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*, 31: 126-146.

Medina, G., Rumayor, A., Cabañas, B., Luna, M., Ruíz, A., Gallegos, C., Madero, J., Gutiérrez, R., Rubio, S. y Bravo, A. 2003. Potencial productivo de especies agrícolas en el estado de Zacatecas. INIFAP-CEZAC. p. 21.

Mutegi, C., Ngugi, H., Hendriks, S. y Jones, R. 2012. Factors associated with the incidence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin contamination of peanuts in the Busia and Homa bay districts of western Kenya. *Plant Pathology*, 61: 1143-1153.

Nakai, V., Rocha, L., Gonçalves, E., Fonseca, H., Marcos, E. y Corrêa, B. 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106: 285-290.

Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.

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. Diario Oficial de la Federación. Diciembre 15 2015, de DOF. Sitio web: www.dof.gob.mx

Paul, E. 2007. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Third edition. Elsevier Inc. USA. pp. 367-368.

Patten, C. y Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.

Pérez, G., Gómez, G., Nápoles, M. y Morales, B. 2008. Aislamiento y caracterización de rizobios aislados de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y forrajes*, 31: 151-158.

Pildain, M., Frisvad, J., Vaamonde, G., Cabral, J., Varga, J. y Samson, R. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 725-735.

Punos, L. e Iglesias, M. 2005. Relación entre el nivel de nodulación y la fertilización nitrogenada en soja. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. pp. A-051.

Rao, A. 1962. Fungal populations in the rhizosphere of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant and Soil*, 17: 260-266.

Raper, K. y Kenell, D. 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins. pp. xii-686.

Riascos, D., Sarria, G., Varón, F., Gómez, A. y Mosquera, A. 2011. Reconocimiento de hongos con potencial benéfico asociados a la rizósfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* H. B. K.) en la región del Pacífico del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*, 60: 319-327.

Rossetto, C., Silva, O., y Araújo, A. 2005. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural*, 35: 309-315.

Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. y Andersen B. 2010. Food and in Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. pp. 106-151.

Scussel, V., da Rocha, M., Lorini, I., Sabino, M., Rosa, C da R. y Carvajal, M. 2008. Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II. Florianópolis, SC, Brasil: Ed. UFSC. pp. 545-556.

SIAP. Cierre de la producción agrícola por estado. Año 2014. Cultivo: Cacahuat. SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Diciembre 02 2015, de DOF. Sitio web: www.siap.gob.mx

Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S. y Netrusov, A. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162: 69-76.

Tubajika, K., Mascagni, H., Damman, K. y Russin, J. 1999. Nitrogen Fertilizer Influence on Aflatoxin Contamination of Corn in Louisiana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 5257-5260.

Vera-Núñez J.A., Peña-Cabriales J.J., Herrera-Estrella L., Nieto F., Salgado-García S., Palma-López D.J., Ortíz-Ceballos A., Pastrana-Aponte L., Barrón-Freyre S., Grageda-Cabrera O.A. y Fragoso C. 2006. Improving agriculture productivity in the savannah of Tabasco state, Mexico. I. Management of maize and sorghum production systems. In: International Atomic Energy (IAEA). Management practices to improving sustainable crop production in tropical acid soils, IAEA Proceedings Series, Vienna, Austria, pp. 255-272.

Widstrom, N., Guo, B. y Wilson, D. 2003. Integration of Crop Management and Genetics for Control of Preharvest Aflatoxin Contamination of Corn. *Journal of Toxicology*, 22: 195-223.

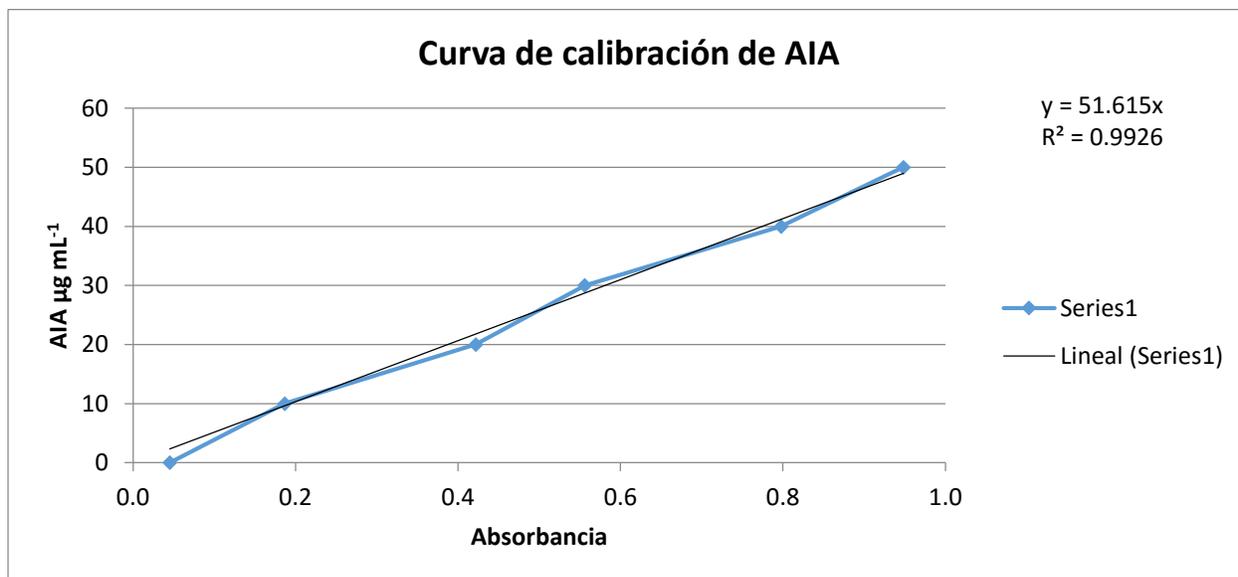
Yu, C., Hu, X., Deng, W., Li, Y., Xiong, C., Ye, C., Han, G. y Li, X. 2015. Changes in soil microbial community structure and functional diversity in the rhizosphere surrounding mulberry subjected to long-term fertilization. *Applied Soil Ecology*, 86: 30-40.

Zak, J. y Willig, M. 2004. Fungal biodiversity patterns. In Mueller, G.; Bills, G. y Foster, M. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press, USA. pp. 59-75.

Zarea, M., Karimi, N., Goltapeh, E. y Ghalavand, A. 2011. Effect of cropping systems and arbuscular mycorrhizal fungi on soil microbial activity and root nodule nitrogenase. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10: 109-120.

XI. APÉNDICE

1) Curva de calibración de ácido indolacético en medio ELMA

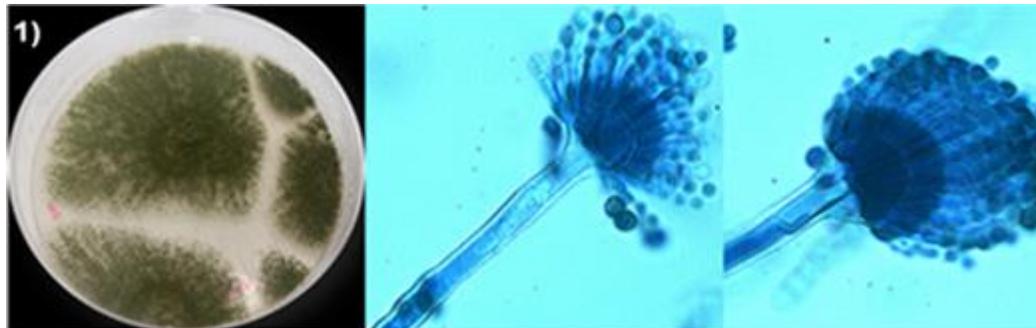


2) Descripción macro y microscópica de los aislados fúngicos pertenecientes al grupo *A. flavus* obtenidos de granos de cacahuate criollo de Tehuiztzingo

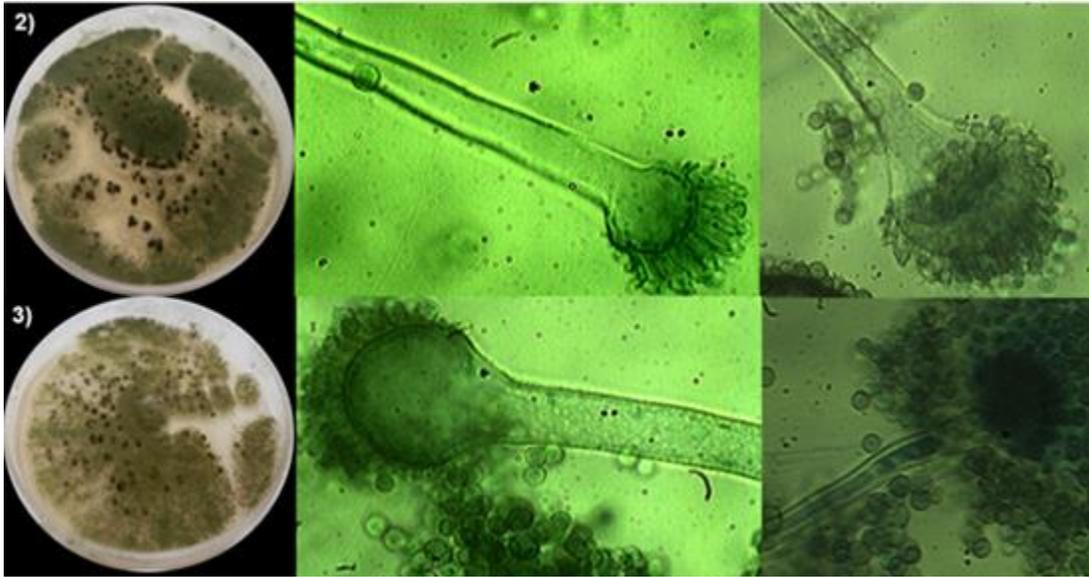
Condiciones del grano	No. aislado	Posibles especies de <i>Aspergillus</i>	Descripción	
			Macroscópica	Microscópica
Recién cosechado	1	<i>Aspergillus oryzae</i>	Colonia verde amarillenta granulosa sin presencia de esclerocios.	Conidióforo no equinulado, cabeza conidial subclavata, esterigmata uniseriado, con esporas redondas, lisas y café.
Almacenado en sacos durante 5 meses	2	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granuloso con presencia de esclerocios.	Conidióforo no equinulado, cabeza conidial con forma subclavata y esporas café, redondas y lisas.
	3	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde seco granuloso menos intenso que el aislado anterior y con presencia de esclerocios.	Sus características no correspondían a las que presentan las especies de <i>Aspergillus</i> reportadas.
	4	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde olivo granulosa sin presencia de esclerocios.	Cabeza conidial redonda y esporas café ornamentadas.
Almacenado a granel durante 11 meses	5	<i>A. flavus</i>	Colonia verde amarillenta granulosa que presentaba esclerocios y reverso amarillo en el medio.	Cabeza conidial era subglobosa con esterigmata uniseriado y esporas no ornamentadas.
	6	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granulosa con anillos concéntricos sin esclerocios.	Conidióforo ornamentado, con septos cercanos a la cabeza conidial subclavata y esporas café ornamentadas.
	7	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde limón granulosa dispersa, reverso del medio amarillo y con presencia de esclerocios-	Cabeza conidial muy elongada, conidióforo equinulado y esporas lisas.
	8	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde amarillenta granulosa con presencia de esclerocios.	Cabeza conidial bifurcada muy corta, cercana al micelio, con esterigmata uniseriado y esporas redondas, lisas y café.
Almacenado en sacos durante 14 meses	9	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granulosa con presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata, esterigmata uniseriado y esporas redondas, café y equinuladas.
	10	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde amarillenta granulosa con presencia de esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo equinulado, micelio septado, esterigmata biseriado y esporas café, redondas y lisas.

11	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde militar granulosa con presencia de esclerocios y reverso amarillo en el medio.	Micelio septado, conidióforo equinulado, esterigmata uniseriado y esporas cafés, redondas y lisas.
12	<i>A. flavus</i>	Colonia verde olivo granulosa sin presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado y septado, cabeza conidial con esterigmata biseriado y esporas cafés ornamentadas.
13	<i>A. flavus</i>	Colonia verde amarillenta granulosa con reverso del medio amarillo claro.	Conidióforo equinulado y septado con esterigmata uniseriado y esporas cafés, redondas y lisas.
14	<i>A. flavus</i>	Colonia verde amarillenta granulosa con reverso del medio amarillo-naranja y sin presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado con esterigmata biseriado y esporas cafés, redondas y lisas.
15	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde amarillenta granulosa con reverso del medio amarillo y sin presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata y esterigmata uniseriado además de esporas redondas, lisas y cafés

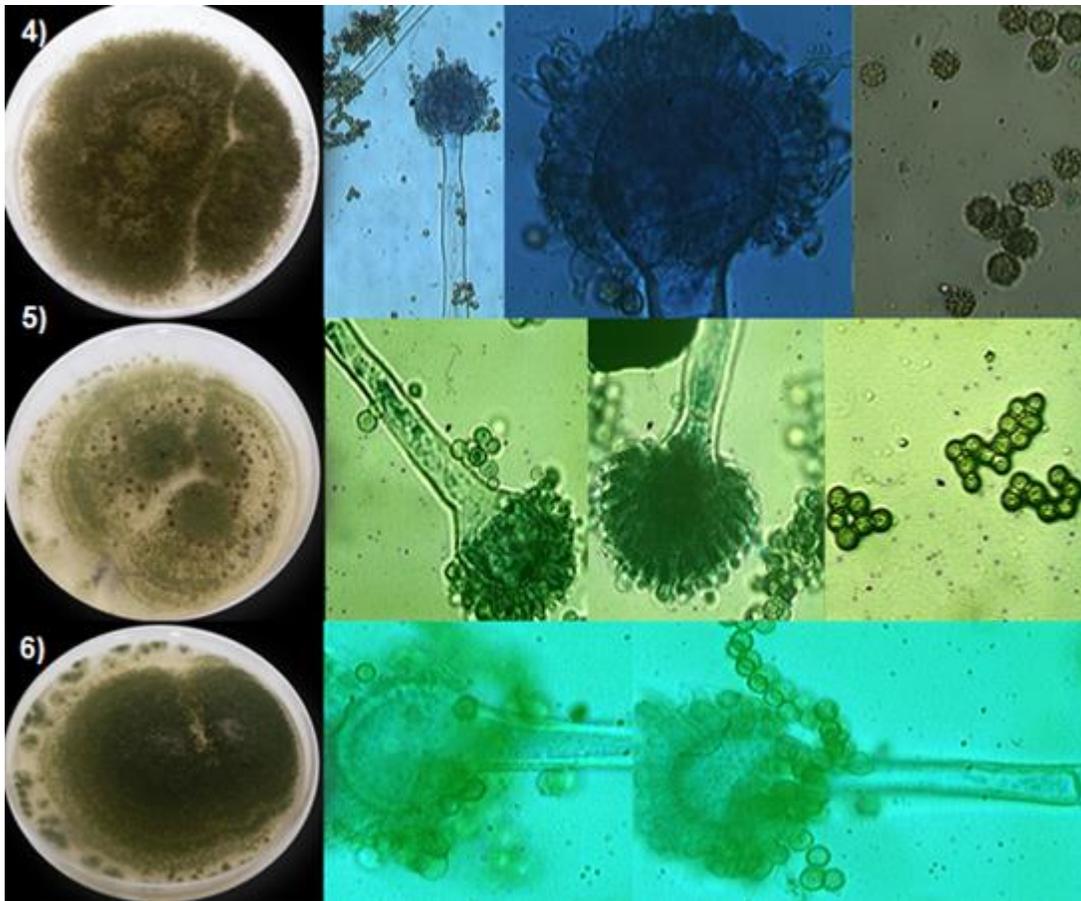
**Cáscara de
cacahuate
almacenado en
sacos durante
14 meses**



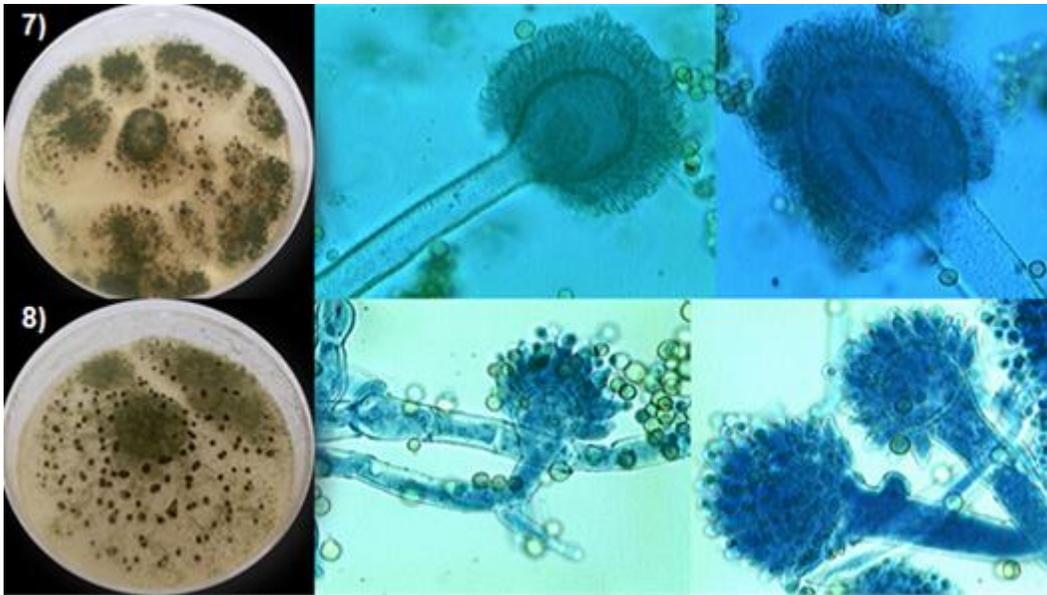
1) *Aspergillus oryzae* aislado de granos de cacahuate criollo recién cosechado.



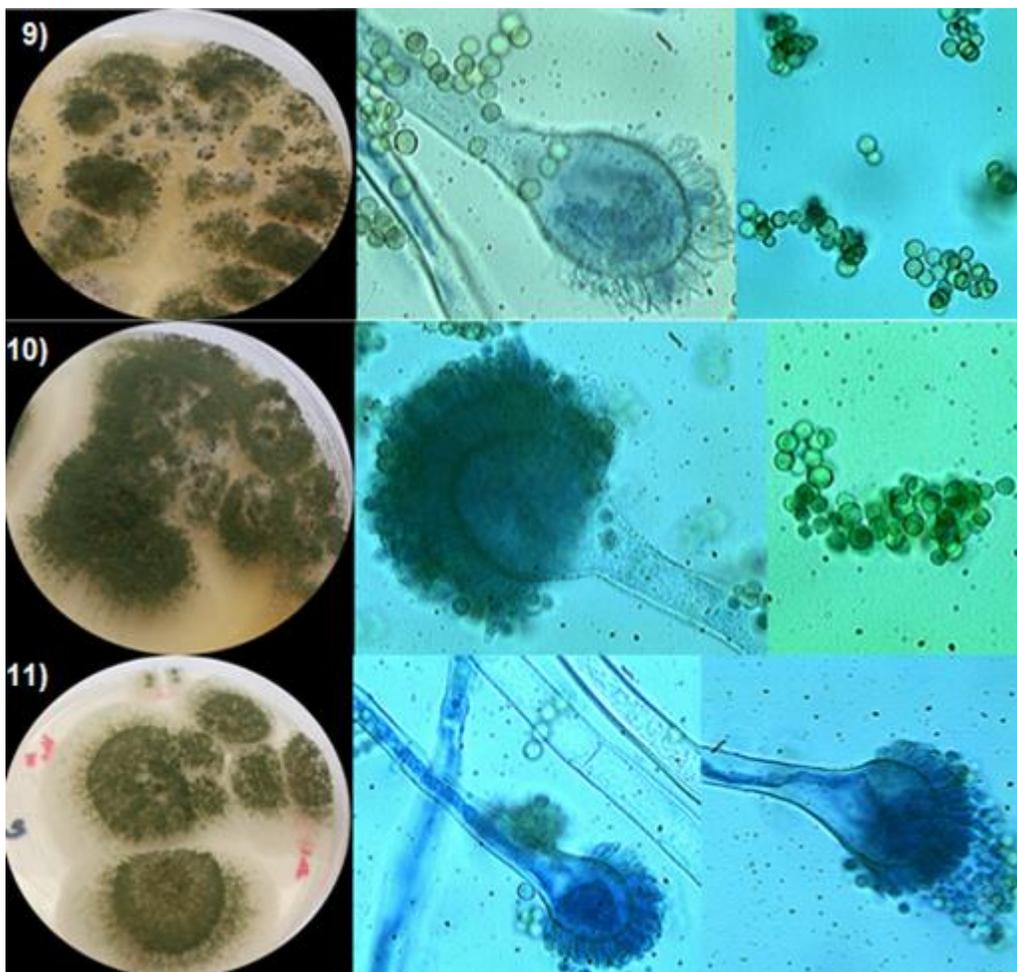
2) *Aspergillus arachidicola* y 3) *Aspergillus* sp. aislados de granos de cacahuate criollo almacenado durante 5 meses en sacos.



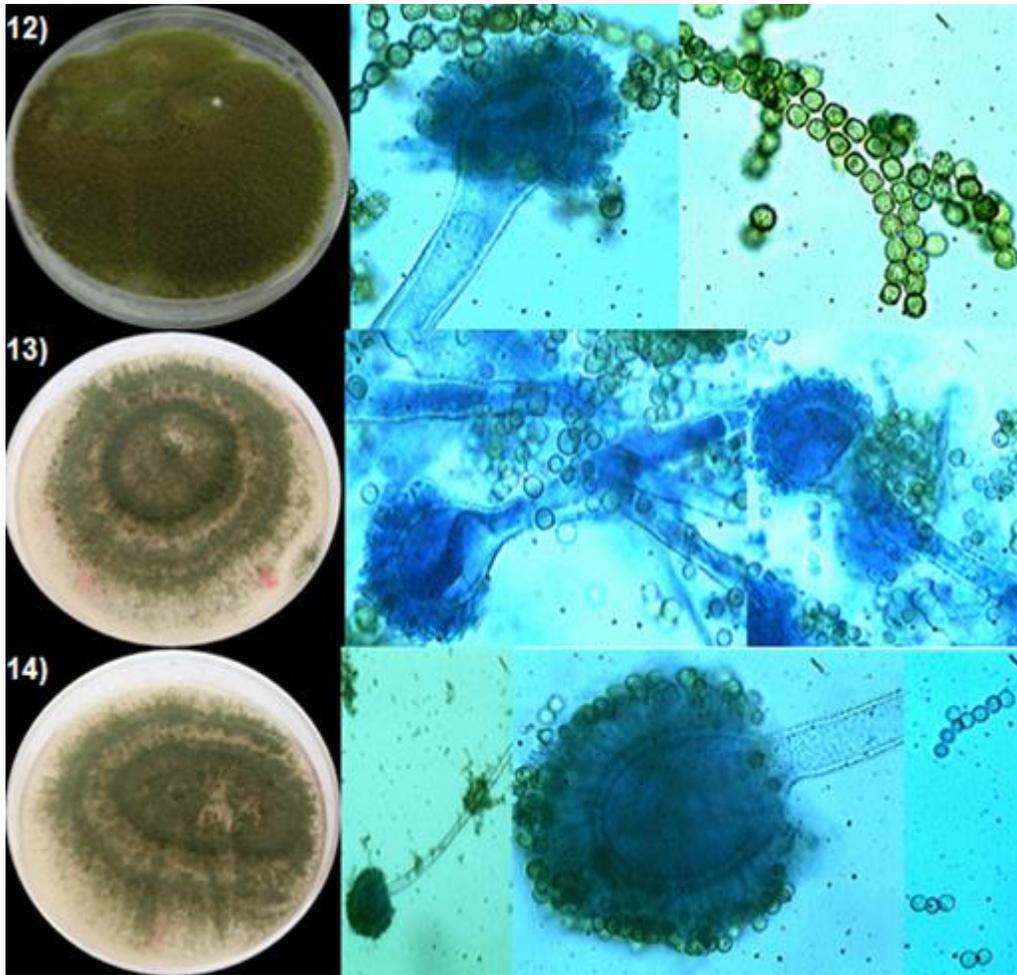
4) *Aspergillus* sp., 5) *A. flavus* y 6) *A. arachidicola* aislados de granos de cacahuate criollo almacenado durante 11 meses a granel.



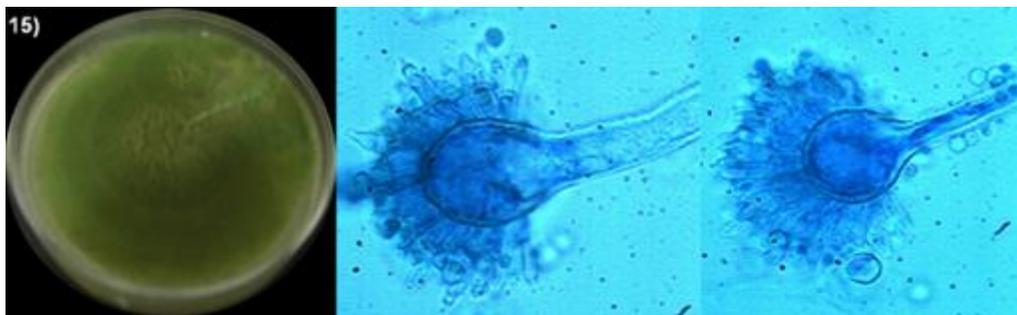
7) y 8) *Aspergillus* sp. aislados de granos de cacahuate criollo almacenado durante 11 meses a granel.



9), 10) y 11) *A. arachidicola* aislados de granos de cacahuate criollo almacenado 14 meses en sacos.

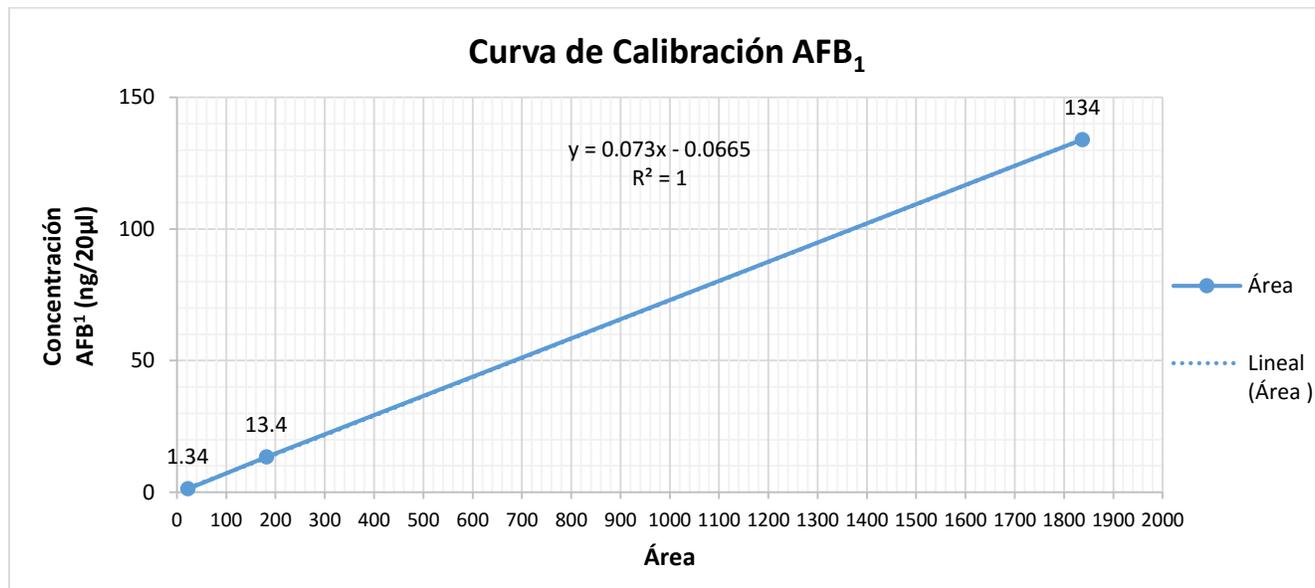


12), 13) y 14) *A. flavus* aislados de granos de cacahuete criollo almacenado durante 14 meses en sacos.



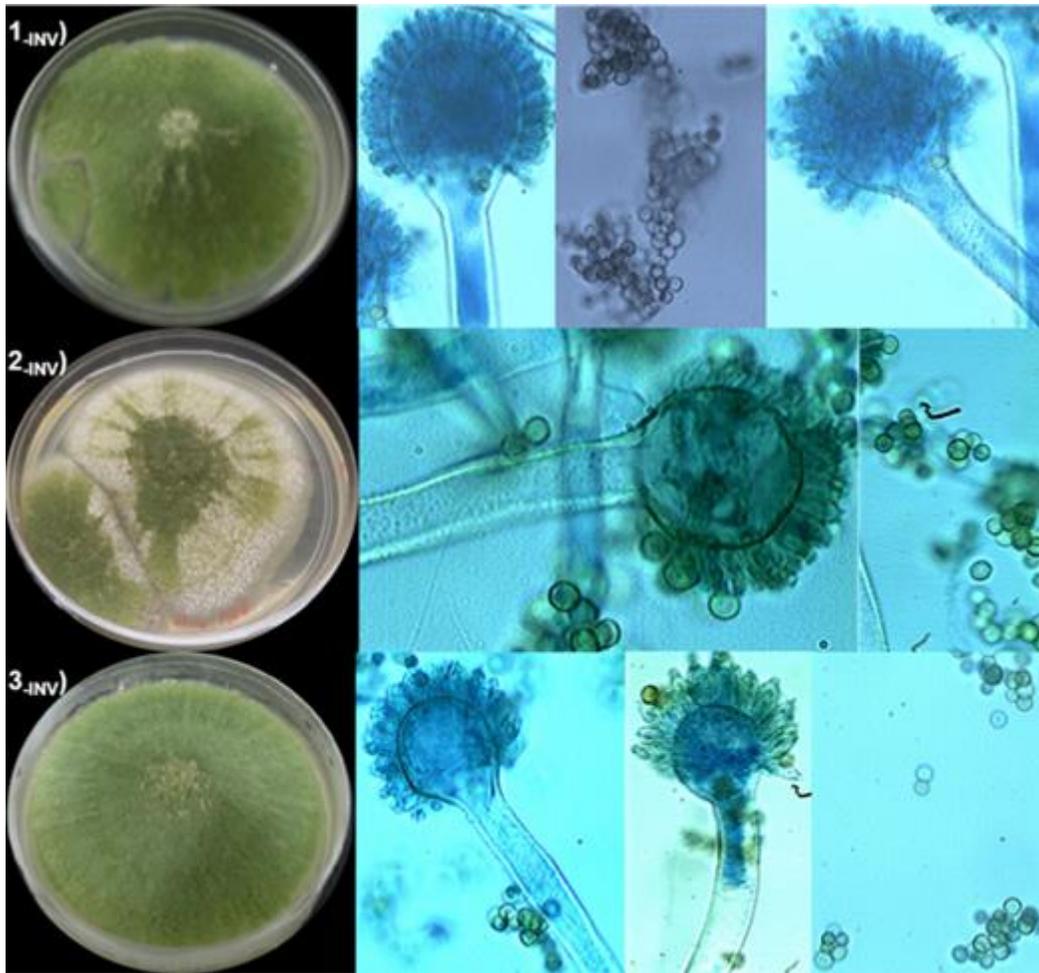
15) *Aspergillus arachidicola* aislado de cáscara de cacahuete criollo almacenado durante 14 meses en sacos.

3) Curva de calibración de AFB₁



4) Microbiota fúngica con características pertenecientes a la sección *A. flavi* en suelo de cultivo 45 d después de la siembra de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero

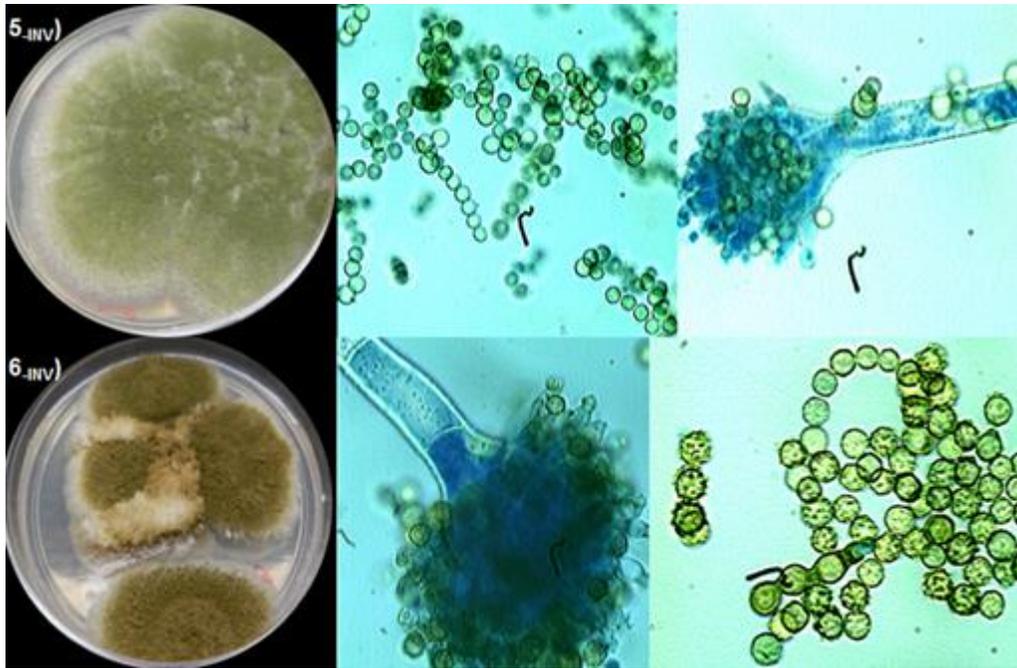
Tratamiento	No. aislado	Posibles especies de <i>Aspergillus</i>	Descripción	
			Macroscópica	Microscópica
Suelo en condiciones naturales	1-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde amarillenta granulosa sin presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subglobosa con esterigmata uniseriado y con esporas cafés, redondas y lisas.
	2-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granuloso con presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata con esterigmata uniseriado y con esporas cafés, redondas y lisas.
	3-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granulosa sin presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata con esterigmata uniseriado y con esporas cafés, redondas y lisas.
Suelo + <i>A. parasiticus</i>	4-INV	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde granulosa dispersa sin esclerocios.	Las características de la cabeza conidial no correspondían a las reportadas para las especies conocidas del género <i>Aspergillus</i> .
Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	5-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde granulosa sin presencia de esclerocios.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata y esporas cafés, redondas y lisas.
	6-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde olivo granulosa sin presencia de esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo equinulado y septado cerca de la cabeza conidial, esterigmata uniseriado con esporas redondas cafés ornamentadas.



1-INV), 2-INV) y 3-INV) *Aspergillus arachidicola* aislados de suelo en condiciones naturales.



4-INV) *Aspergillus* sp. aislado de suelo + *A. parasiticus*.

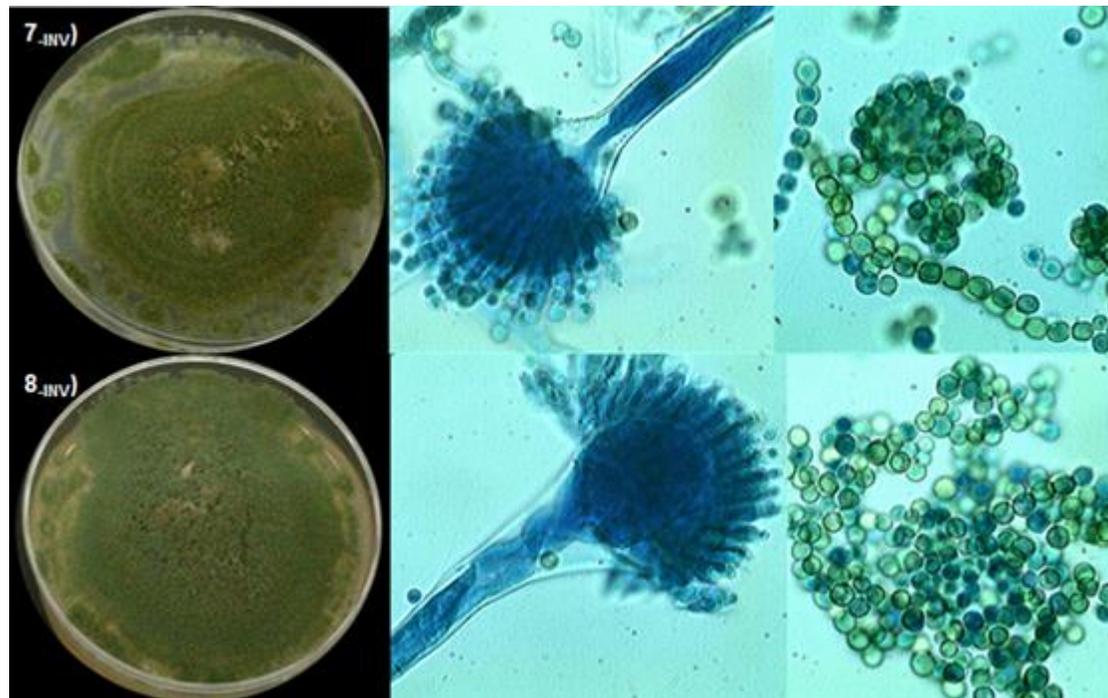


5-INV) y 6-INV) *A. arachidicola* aislados de suelo + *Rhizobium* + *A. parasiticus*.

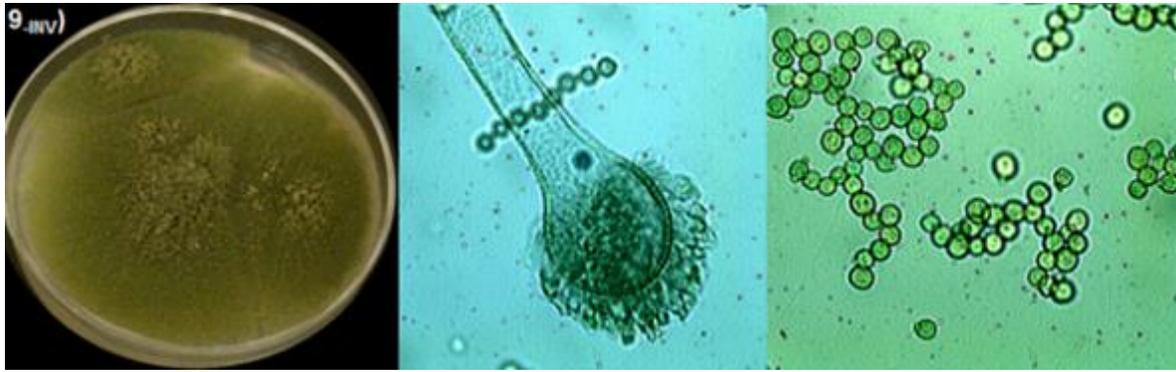
5) Microbiota fúngica con características pertenecientes a la sección *A. flavi* en suelo de cultivo 90 d después de la siembra de cacahuate criollo bajo condiciones de invernadero

Tratamiento	No. aislado	Posibles especies de <i>Aspergillus</i>	Descripción	
			Macroscópica	Microscópica
Suelo en condiciones naturales	7-INV	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde granulosa con anillos concéntricos y reverso del medio de color amarillo.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata y esporas dispuestas en forma de cadena.
	8-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde amarillenta granulosa con presencia de esclerocios y reverso del medio amarillo.	Micelio septado, conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata, con esterigmata uniseriado y esporas café, redondas y lisas.
Suelo + Fertilización Química (FQ)	9-INV	<i>A. flavus</i>	Colonia verde seco granulosa, con ausencia de esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo equinulado con esterigmata uniseriado y las esporas eran redondas, café y ornamentadas.
Suelo + <i>Rhizobium</i>	10-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granulosa, con esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo septado y no equinulado, cabeza subglobosa y esporas café, redondas y lisas.
Suelo + <i>A. parasiticus</i> + FQ	11-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco amarillenta granulosa, presentaba esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata con esterigmata uniseriado y esporas café, redondas y lisas.
	12-INV	<i>A. flavus</i>	Colonia amarillo verde granulosa, sin esclerocios y reverso del medio incoloro.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subglobosa con esterigmata uniseriado y esporas café, ovaladas y ornamentadas.

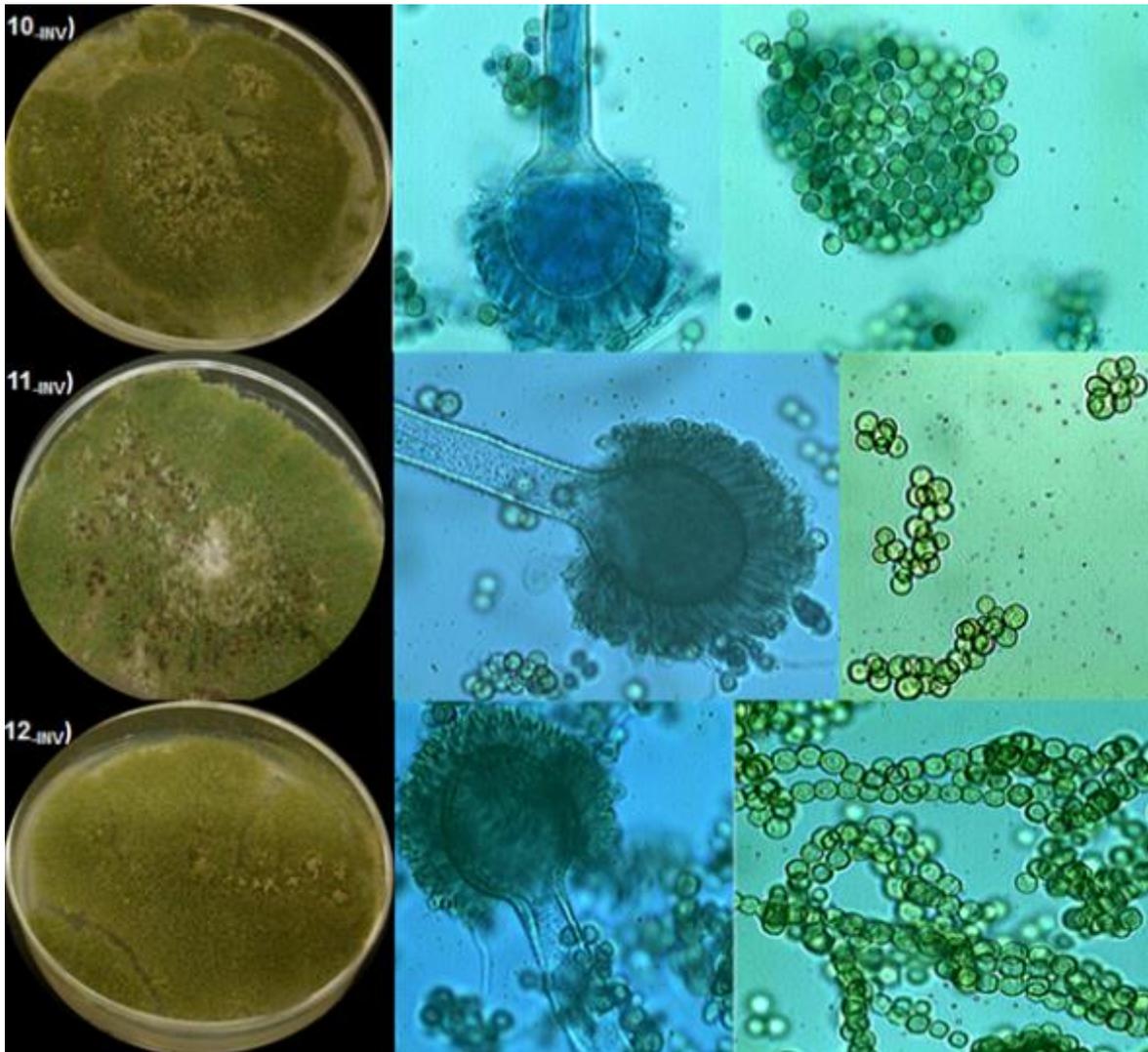
Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i>	13-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde seco granulosa con esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo no ornamentado con cabeza conidial subclavata, esterigmata uniseriado y esporas café, redondas y ornamentadas.
Suelo + <i>Rhizobium</i> + <i>A. parasiticus</i> + HMA	14-INV	<i>A. arachidicola</i>	Colonia verde amarillenta granulosa con esclerocios y reverso del medio amarillo.	Conidióforo equinulado, cabeza conidial subclavata con esterigmata uniseriado y esporas café, redondas y lisas.
	15-INV	<i>Aspergillus</i> sp.	Colonia verde seco amarillenta granulosa con esclerocios y reverso del medio amarillo.	Micelio septado, conidióforo ornamentado, esterigmata uniseriado y esporas café, redondas y equinuladas.



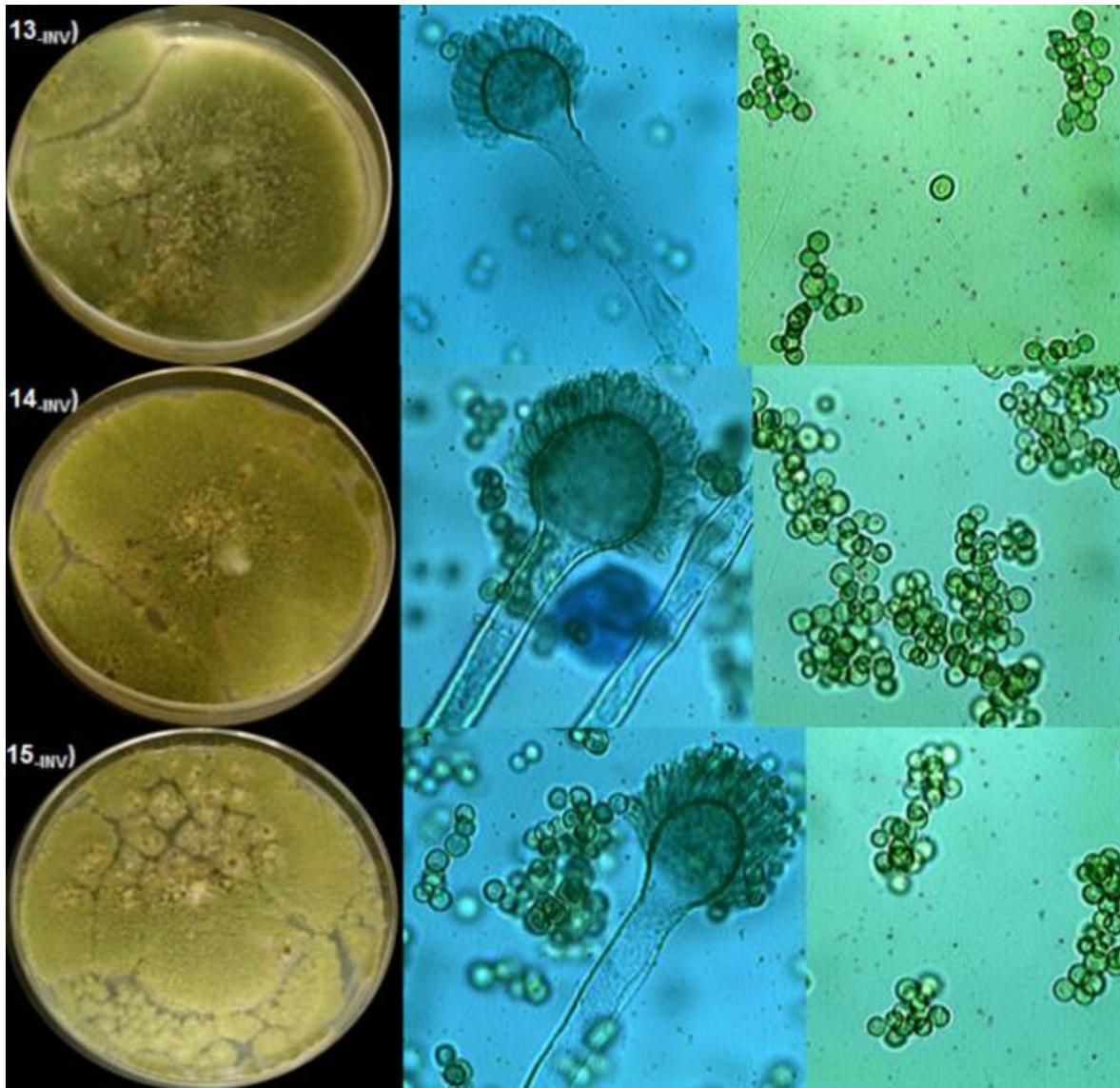
7-INV) *Aspergillus* sp. y 8-INV) *A. arachidicola* aislados de suelo en condiciones naturales.



9-INV) *A. flavus* aislado de suelo fertilizado químicamente.



10-INV) *Aspergillus arachidicola* aislado de suelo + *Rhizobium*, 11-INV) *A. arachidicola* y 12-INV) *A. flavus* aislados de suelo + Fertilización química + *A. parasiticus*.



13-INV) *A. arachidicola* aislado de suelo + *Rhizobium* + *A. parasiticus*, 14-INV) *A. arachidicola* y 15-INV) *Aspergillus* sp. aislados de suelo + *Rhizobium* + HMA + *A. parasiticus*.