

Identificación de las especies micotoxigénicas de *Aspergillus* asociadas a maní (*Arachis hypogaea*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) costarricense y determinación de su capacidad toxigénica

Fabiola Carranza Mesén

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciado en Agronomía

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Escuela de Agronomía

2021

Identificación de las especies micotoxigénicas de *Aspergillus* asociadas a maní (*Arachis hypogaea*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) costarricense y determinación de su capacidad toxigénica.

Fabiola Carranza Mesén

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciado en Agronomía

  
\_\_\_\_\_

Director de tesis

María Viñas Meses Ph.D.

  
\_\_\_\_\_

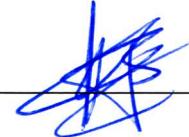
Miembro del tribunal

María del Milagro Granados Montero Ph.D.

  
\_\_\_\_\_

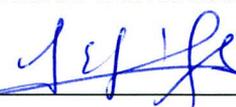
Miembro del tribunal

Mónica Blanco Meneses Ph.D.

  
\_\_\_\_\_

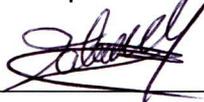
Miembro del tribunal

Néstor Cháves Barrantes Ph.D.

  
\_\_\_\_\_

Director de la Escuela

Luis Gómez Alpízar Ph.D.

  
\_\_\_\_\_

Sustentante

Bach. Fabiola Carranza Mesén

## **Dedicatoria**

A Dios y mi familia por su gran ayuda y apoyo en todos los aspectos de mi vida.

A mi mamá Marta Mesén Leandro por darme su ayuda, amor y esfuerzo incondicional siempre, a pesar de todas las dificultades de la vida. A mi pareja Andrés García Jiménez y mi hermano Michael Mesén Leandro por ser la fuerza que me impulsa a seguir adelante cuando creía que no podía.

Al Ph.D María Viñas Meses y al M. Sc. Diego Bogantes por su amistad, consejos, apoyo, paciencia y acompañamiento es este proceso. Siempre apreciaré mucho todos sus consejos que me hicieron crecer como persona y profesional.

## **Agradecimientos**

A la Ph.D. María del Milagro Granados Montero, Ph.D. Mónica Blanco Meneses y Ph.D. Néstor Cháves Barrantes por sus consejos y acompañamiento en todo este proceso.

A Katherine Hidalgo Montoya y Vallery González Marín por darme la mayor alegría, de una hermosa sobrina además de su amistad y consejos.

A Danilo Alvarado Quesada y Kelvin Arce Villalobos personal técnico del laboratorio de micotoxinas del Centro para Investigaciones en Grano y semillas por su apoyo y colaboración en la investigación.

A mis amigos y colegas Stephanie Mayorga Arce, Kelly Salinas, Cristian Fallas, Steven Quirós y Grettel Picado por toda la alegría que me brindaron en nuestro paso por la universidad, gracias por siempre estar para ayudarme y apoyarme. A Ana Guido Mora por enseñarme todo lo que se hace en el laboratorio y tenerme tanta paciencia, sin ti hubiera sido imposible.

A Gabriela Vargas Zeledón, mi profesora de biología del colegio, pero más que eso mi amiga, gracias por ayudarme a darme cuenta cual es mi vocación y pasión.

A todos los que me apoyaron de alguna manera en alcanzar la meta y cumplir este sueño.

## Índice general

1.	Resumen .....	xi
2.	Introducción .....	13
3.	Revisión literaria .....	16
3.1	Generalidades de las micotoxinas .....	16
3.1.1	Definición e importancia de las micotoxinas.....	16
3.1.2	Factores que influyen la producción de micotoxinas .....	17
3.1.3	Métodos de detección de micotoxinas.....	18
3.2	Aflatoxinas .....	19
3.2.1	Género <i>Aspergillus</i> y tipos de aflatoxinas.....	19
3.2.2	Importancia de las aflatoxinas .....	21
3.2.3	Biosíntesis de aflatoxinas .....	22
3.3	Control de aflatoxinas .....	24
3.3.1	Métodos de control en general .....	24
3.3.2	Control biológico.....	26
3.4	Generalidades de los cultivos de maní y frijol .....	27
3.4.1	Frijol.....	27
3.4.2	Maní .....	28
4.	Justificación .....	29
5.	Materiales y Métodos.....	31
5.1	Sitio experimental .....	31
5.2	Material vegetal.....	31
5.3	Aislamiento de <i>Aspergillus</i> spp. a partir de granos de maní y frijol .....	31
5.4	Identificación de las especies de <i>Aspergillus</i> aisladas de maní y frijol. ....	34
5.5	Identificación de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> no toxigénicos. ....	35
5.6	Determinación de la capacidad toxigénica de los aislamientos. ....	36
5.7	Análisis estadístico.....	37
6.	Resultados.....	38
6.1	Aislamiento de <i>Aspergillus</i> a partir de granos de frijol.....	38
6.2	Aislamiento de <i>Aspergillus</i> spp. en maní .....	47
7.	Discusión .....	50
7.1	Identificación de <i>Aspergillus</i> spp. en granos de frijol y maní.....	50
7.2	Especies de <i>Aspergillus</i> identificadas y su toxicidad .....	53

7.3	Cepas no toxigénicas de <i>Aspergillus flavus</i> .....	54
8.	Conclusiones .....	56
9.	Sugerencias.....	56
10.	Anexos.....	57
11.	Bibliografía.....	67

## Índice de cuadros

Cuado 1. Número de muestras colectadas en algunas zonas productoras de frijol y maní de Costa Rica durante el 2019 y el 2020.....	31
Cuado 2. Condiciones para la detección de iones mediante rango específico de escaneo de masas durante el análisis de micotoxinas con HPLC-MS/MS. ....	37
Cuado 3. Porcentaje de especies de <i>Aspergillus</i> identificadas en frijol rojo, negro, blanco y mantequilla. Entre paréntesis, cuadrados se muestra el número de aislamientos que representa cada porcentaje. Número de muestras total: 159 aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. ....	42
Cuado 4. Porcentaje de aislamientos de <i>Aspergillus</i> provenientes de maní identificados según especie. Entre paréntesis, cuadrados se muestra la cantidad de muestras que representa cada porcentaje. Número de muestras total: 24 aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. ....	49
Cuado 5. Especies del género <i>Aspergillus</i> identificadas en las muestras de granos de maní y frijol y las posibles micotoxinas que estas producen. El signo (+) significa que producen la micotoxina, mientras que el signo (–) significa que no la producen. Fuente: (Lamboni <i>et al.</i> , 2016; Abarca <i>et al.</i> , 2000; Bau, 2005)	

## Índice de figuras

Figura 1. Efectos en la salud del ser humano a la exposición a distintos agentes. Tomado de Soriano, 2007.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Conidióforos típicos del género <i>Aspergillus</i> . Tomado de (Pildain, 2006).....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Estructuras moleculares de las aflatoxinas. Tomado de Marín <i>et al.</i> , 2013.....	.....
	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Esquema de ruta de biosíntesis de aflatoxina B1. Tomado de Cáceres <i>et al.</i> (2020)	.....
	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5. Frecuencia de genes eliminados del cluster 70 kb del cromosoma 3 de <i>A. flavus</i> en 34 cepas atoxigénicas. Tomado de Wei <i>et al.</i> , 2014 .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Crecimiento de micelio en granos de frijol rojo (A), microconidios observados al microscopio característicos del género <i>Aspergillus</i> (B), micelio obtenido a partir de cada monospórico creciendo en medio CYA25 luego de 7 días de cultivo (C). .....	33
Figura 7. Porcentaje de muestras de frijol que presentaron contaminación con <i>Aspergillus</i> spp. según la región socioeconómica de Costa Rica donde se recolectaron. El número entre paréntesis cuadrado en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 83 muestras con <i>Aspergillus</i> spp. ....	39
Figura 8. Porcentaje de muestras que presentaron contaminación con <i>Aspergillus</i> spp. según el tipo de frijol (mantequilla, blanco, negro y rojo). El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 83 muestras con <i>Aspergillus</i> spp. ....	40
Figura 9. Porcentaje de aislamientos fúngicos de <i>A. flavus</i> y otras especies de <i>Aspergillus</i> en muestras de frijol mantequilla, blanco, negro y rojo. El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 159 aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. ....	41
Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos usando ADN de muestras de <i>A. flavus</i> para amplificar los genes <i>afIR</i> (A) y <i>afIT</i> (B). ....	43
Figura 11. Porcentaje de aislamientos no toxigénicos de <i>A. flavus</i> en granos de frijol blanco, negro y rojo. El número entre paréntesis cuadrados en cada barra	

corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 83 aislamientos de *A. flavus*. ..... 45

Figura 12. Distribución de aislamientos atoxigénicos de *A. flavus* según las regiones donde se recolectaron las muestras de frijol negro, rojo o blanco. Cada punto en el mapa representa un aislamiento, el color de cada punto identifica el tipo de frijol del cual procede el aislamiento..... 46

Figura 13. Concentración de aflatoxina B1 producida por aislamientos toxigénicos de *A. flavus* en granos de frijol negro (6A2, 11B3, 13A1, 21E2, 30A2) y rojo (71A1). Letras diferentes sobre cada barra indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada aislamiento según prueba DGC como método estadístico.  
47

Figura 14. Porcentaje de aislamientos fúngicos identificados como *Aspergillus* spp. por Región Socioeconómica de Costa Rica en granos de maní. El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 19 muestras con *Aspergillus* spp. .... 48

Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos usando ADN de muestras de *A. flavus* para amplificar los genes *afIR* (A) y *afIT* (B). ..... 49

## Índice de anexos

Anexo 1. Componentes para las reacciones de PCR en tiempo final utilizadas.	57
Anexo 2. Perfil térmico del PCR en tiempo final, para la amplificación de región ITS en <i>Aspergillus</i> .	57
Anexo 3. Perfil térmico de PCR en tiempo final para la amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas en <i>Aspergillus flavus</i> .	58
Anexo 4. Muestras recolectadas de frijol	58
Anexo 5. Muestras recolectadas de maní	61
Anexo 6. Identificación a nivel de especie de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. en frijol.	62
Anexo 7. Identificación a nivel de especie de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. en maní.	64

## 1. Resumen

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos, como respuesta a estímulos ambientales, que afectan la salud de seres humanos y animales. Los principales géneros de hongos productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Entre ellos, *Aspergillus* es el que presenta mayor importancia, ya que a este pertenecen las especies productoras de aflatoxinas. Estas micotoxinas son las más tóxicas conocidas hasta el momento, principalmente la aflatoxina B1, producida por *A. flavus*, es catalogada como sustancia cancerígena de grado 1. En Costa Rica, existen dos decretos en los cuales se establecen los límites máximos de aflatoxinas en los productos agrícolas, sin embargo, existe falta de información sobre los hongos micotoxigénicos presentes en los productos agrícolas a nivel nacional. Lo cual constituye un riesgo para la salud humana, ya que existen productos de alto consumo como el frijol el cual es parte de la dieta básica de los costarricenses, y el maní, que a pesar de su producción a nivel nacional es bajo, es importante debido a la variedad de productos alimenticios que se producen a partir de él y su alta susceptibilidad a la infección por parte de hongos micotoxigénicos. Este trabajo se centró en el género *Aspergillus*, principalmente por su impacto a nivel económico y de riesgo para la salud de los consumidores, por lo que, además de identificar las especies presentes en granos de maní y frijol producidos a nivel nacional, también se estableció un precedente para la investigación en combate biológico a partir de cepas no toxigénicas de *A. flavus*. Se recolectaron 83 muestras de granos de frijol y 19 de maní, de las cuales 46% y 68% del total de las muestras, respectivamente, presentaron contaminación por *Aspergillus*. En frijol se obtuvo 159 aislamientos identificados de manera molecular amplificando la región ITS1- ITS4. Se determinó que la especie *A. flavus* fue la más predominante en granos de frijol, con el 44% del total de aislamientos. En maní, se obtuvo 24 aislamientos de *Aspergillus*, siendo la especie *A. niger* la de mayor prevalencia (71% del total de aislamientos). Se seleccionaron únicamente los aislamientos identificados como *A. flavus* para realizar un PCR tiempo final amplificando los genes *afIT* y *afIR*, relacionados con

la biosíntesis de aflatoxinas. Se identificaron como toxigénicas las especies que presentaron amplificación en alguno de estos genes. Este proceso permitió preseleccionar 30 aislamientos no toxigénicos en frijol, mientras que, en maní no se identificaron especies no toxigénicas de *A. flavus*. Se inocularon granos de frijol molido con los 30 aislamientos preseleccionados, con el fin de corroborar la no toxicidad de estos aislamientos mediante extracción de micotoxinas y análisis con Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas. Luego de este proceso, se determinó que, de los 83 aislamientos identificados como *A. flavus*, 25 son no toxigénicos. Con los resultados obtenidos se nota que existe una problemática en cuanto a la contaminación por hongos micotoxigénicos en los granos de frijol y maní producidos a nivel nacional, lo cual justifica la necesidad de implementar medidas de control eficientes. Esta investigación brinda un primer aporte para la implementación de un método de combate biológico de *A. flavus* a partir de cepas no toxigénicas.

## 2. Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos, como respuesta a estímulos ambientales, que afectan la salud de seres humanos y animales. La contaminación de alimentos por micotoxinas se puede presentar durante todo el proceso productivo por lo que la posibilidad de contaminación es alta (Adeyeye, 2016). Se estima que la contaminación de alimentos a nivel mundial es de un 25% según la Organización Mundial de la Salud (FAO, S.F), sin embargo, se han realizado estudios en los que se ha observado una contaminación de un 72% de productos agrícolas con al menos una toxina y un 38% con dos o más toxinas (Streit *et al.*, 2013).

Los principales géneros de hongos micotoxigénicos son: *Aspergillus* P. Micheli, *Penicillium* Link y *Fusarium* Link, los cuales producen toxinas como: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, zearalenona, entre otros (Misihairabgwi *et al.*, 2019). Las aflatoxinas, que son las micotoxinas producidas por el género *Aspergillus*, presentan una gran importancia debido a que son las más tóxicas y cancerígenas entre los compuestos micotoxigénicos conocidos (Alves *et al.*, 2019).

Las cuatro principales aflatoxinas son: B1, B2, G1 y G2 (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2); de las cuales la AFB1 ha sido calificada como carcinógeno grado 1 (World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 1993). Esta micotoxina genera carcinoma hepatocelular en humanos, por esto es considerada una de las más relevantes desde el punto de vista de la salud humana y animal (Chawanthayatham *et al.*, 2017). El órgano humano más afectado por AFB1 es el hígado, ya que, puede ocasionar necrosis o hemorragia, dependiendo del grado de contaminación, además de cáncer hepático (Palacio, 2016; Ostry *et al.*, 2017).

A pesar de su alta capacidad toxigénica y de afectación a la salud humana y animal, se han detectado cepas de *Aspergillus* que no producen dichas toxinas, lo que genera una posibilidad para que estas cepas desplacen a las toxigénicas y por

tanto puedan ser utilizadas como controladores biológicos a nivel de campo (Kagot *et al.*, 2019).

La presencia de aflatoxinas en productos para consumo humano y animal, además de producir efectos adversos en la salud, también repercute en la economía, ya que, estos productos deben ser descartados a causa de su falta de inocuidad y calidad. Tal es el caso de un cargamento de 26 000 Kg de maní procedente de Brasil, al cual se le impidió la entrada al país en el 2018 debido a que se detectó concentraciones de aflatoxinas mayores a las permitidas por ley (Lanzas, 2018). Según el Decreto no. 27980-S (1999) en Costa Rica el Ministerio de Salud permite un máximo de 15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de aflatoxinas totales en maní, mientras que, en maíz, arroz, frijol, trigo, entre otros cereales, y en oleaginosas el límite permitido es de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

A pesar de la necesidad de ejercer un control sobre la contaminación de productos agrícolas producida por micotoxinas, en Costa Rica el monitoreo oficial por parte del Servicio Fitosanitario del Estado se realiza únicamente en productos de importación, mientras que los producidos a nivel nacional no cuentan con control alguno, a pesar de que ya se ha detectado la presencia de aflatoxinas, principalmente en granos y semillas (O'Neal, 2017).

A nivel mundial, se implementan distintas metodologías para disminuir la contaminación de granos y semillas por aflatoxinas, entre estas: el uso de cultivares resistentes, control fitosanitario, manejo de relaciones hídricas, disminución de daños mecánicos, combate biológico y manejo poscosecha adecuado que incluye modificaciones en la temperatura y la humedad durante el almacenamiento. Sin embargo, estas alternativas consumen gran cantidad de recursos como tiempo y mano de obra, lo que repercute en pérdida de rentabilidad. Aun realizando estas prácticas y siguiendo las normas establecidas para evitar la producción de aflatoxinas, la contaminación se puede presentar a causa de diversos factores, incluyendo las condiciones ambientales, por lo que el uso de controladores

biológicos en campo presenta un alto potencial al ser más sostenibles con el ambiente y efectivos (Bandyopadhyay *et al.*, 2016; Mwakinyali *et al.*, 2019).

El uso de cepas no toxigénicas han presentado una alta eficacia en el combate biológico de hongos que producen micotoxinas. Kagot *et al.* (2019) menciona que en África se ha presentado una eficiencia de 70% a 90% en la reducción de productos contaminados con aflatoxinas utilizando controladores biológicos provenientes de cepas de distintas zonas del continente africano. En Costa Rica no se ha realizado investigación sobre el tema debido a la falta de identificación de cepas propias de la región. Se debe tomar en cuenta que los hongos presentan alta variabilidad entre regiones esto debido a que se encuentran adaptados a los distintos hábitats y climas (Cotty *et al.*, 2007), por lo que los productos para el control biológico deben ser, dentro de lo posible, formulados con cepas locales para asegurar su adaptación y, por tanto, una mejor eficacia de los productos.

### 3. Revisión literaria

#### 3.1 Generalidades de las micotoxinas

##### 3.1.1 Definición e importancia de las micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, altamente tóxicos, producidos por algunos hongos, los cuales generan efectos negativos en la salud de seres humanos y animales. Son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que no se encuentran directamente relacionados con el crecimiento o reproducción del hongo. Éstas suelen formarse al final de la fase exponencial o al iniciar la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Soriano, 2007).

El término micotoxina deriva de las palabras griegas “mykes” y “toxicum” que significan respectivamente hongo y veneno. El término se utilizó por primera vez en 1962 en Londres, donde se presentó la muerte de aproximadamente 100 000 pavos, esta enfermedad se vinculó al consumo de harina de maní contaminada con metabolitos secundarios de *Aspergillus flavus* (Adeyeye, 2016; Zain, 2010). Se han identificado hasta la fecha 300 tipos de micotoxinas con estructuras, biosíntesis y toxicidad variadas, sin embargo, solo algunas generan problemas de seguridad alimentaria (Palacio, 2016).

Las micotoxinas son producidas por hongos filamentosos, las cuales representan una de las mayores fuentes de contaminación de productos agrícolas, en el campo, durante el desarrollo vegetal, así como en etapas de almacenamiento de granos. Existe una amplia variedad de hongos productores de micotoxinas, con requerimientos ecológicos variados; entre los géneros de mayor importancia se encuentran *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Adeyeye, 2016). Es importante recalcar que la presencia del hongo no implica que éste se encuentre produciendo micotoxinas, por otra parte, si ya se ha contaminado el alimento con la micotoxina, aunque se elimine la sección con crecimiento fúngico, la toxina podría persistir en el producto.

Existe una gran variedad de micotoxinas, entre las de mayor importancia se encuentran las aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, deoxinivalenol, fumonisinas,

patulina y zearalenona, las cuales pueden ser producidas por uno o varios géneros de hongos (Zahra *et al.*, 2019). Las micotoxinas son moléculas muy estables que resisten distintos procesos industriales, como la cocción, por lo que si se detecta contaminación el producto no debe ser consumido (Murphy *et al.*, 2006)

Las micotoxinas generan distintos efectos sobre la salud de seres humanos y animales que pueden ir desde agudos (deterioro hepático, irritación en la piel, dolor abdominal, ictericia) hasta crónicos (cáncer, teratogénesis, inmunosupresión, desnutrición proteica) (Serrano & Cardona, 2015; Murphy *et al.*, 2006).

### **3.1.2 Factores que influyen en la producción de micotoxinas**

La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas puede ocurrir en cualquier etapa de la producción, sin embargo, existen distintos factores que pueden facilitar la colonización del hongo en la planta, lo cual genera que el grano se vea expuesto y posteriormente contaminado por micotoxinas. Esta exposición es más susceptible según el género del hongo y la etapa de producción, por ejemplo, en el caso de *Fusarium* se ve favorecido principalmente antes y durante la cosecha, mientras que para *Aspergillus* y *Penicillium* la contaminación sucede principalmente durante el secado y almacenamiento (Greeff *et al.*, 2020).

La colonización de productos agrícolas por hongos micotoxigénicos se puede ver favorecida por distintos factores tales como: sequía, lesiones, ingreso de plagas, fertilización, malas condiciones de almacenamiento, entre otros. Estos factores se pueden dividir en condiciones ambientales y prácticas de manejo, siendo de mayor influencia el ambiente, tanto en el desarrollo del hongo como en la producción de micotoxinas (Jallow *et al.*, 2021; Daou *et al.*, 2021).

Una de las mayores problemáticas se presenta en la flexibilidad con la que cuentan estos hongos para su desarrollo, ya que pueden afectar gran variedad de cultivos, sin embargo, la presencia del hongo no implica que el producto agrícola se encuentre contaminado por micotoxinas. Los metabolitos secundarios, como las micotoxinas, son sustancias orgánicas que no se encuentran directamente

relacionadas con el crecimiento o reproducción del hongo, se requieren condiciones específicas para que los hongos inicien su biosíntesis. Entre los factores de mayor importancia se encuentran: la temperatura, actividad de agua, humedad relativa, pH del medio, cepa de hongos y sustrato (Daou *et al.*, 2021).

Estos factores varían entre géneros de hongos, pero de manera general se puede decir que la producción de micotoxinas se presenta en un rango de temperatura de 25 a 30 °C y de humedad de 88% a 95% (Daou *et al.*, 2021). Por su parte, la actividad de agua es un término que presenta mayor importancia en poscosecha, siendo una de las variables determinantes para el desarrollo del hongo, así como para la cantidad de micotoxina que este pueda producir. La actividad de agua se define como la relación entre la presión de vapor superficial del grano y la del agua pura a la misma temperatura y presión, este cálculo permite determinar el agua disponible para el crecimiento del hongo; esta variable reemplaza otros parámetros como humedad relativa, al ser más preciso (Gimeno & Martins, 2011).

### **3.1.3 Métodos de detección de micotoxinas**

En el mundo existen cerca de 120 países con normativas de límites máximos de micotoxinas en alimentos, para esto los métodos de detección deben ser rápidos, precisos, confiables, reproducibles y fáciles de usar. Existen tres principales grupos de métodos de detección, estos son: inmunoquímicos, espectroscópicos y cromatográficos (Jallow *et al.*, 2021).

Los métodos inmunoquímicos consisten en la unión de un anticuerpo a la molécula de la micotoxina, estas metodologías son altamente específicas y fáciles de llevar a cabo, además de que se pueden realizar en el sitio donde se recolecta la muestra. Sin embargo, existen ciertas limitantes, ya que en algunos casos no permite medir la concentración de micotoxinas (Jallow *et al.*, 2021).

Las técnicas de detección con métodos espectroscópicos son técnicas no destructivas que permiten la identificación de las toxinas por medio del comportamiento de la luz, es decir, la absorción, emisión y dispersión de esta en la

muestra. Su principal ventaja consiste en que son métodos no destructivos, por lo que permite identificar y eliminar los productos contaminados dentro de un lote. Sin embargo, estas metodologías aún son muy nuevas por lo que se requiere más investigación en esta área para tener resultados confiables (Jallow *et al.*, 2021).

La cromatografía es la metodología más antigua utilizada para la detección de micotoxinas, se basa en la separación de la muestra en la fase sólida y líquida (Jallow *et al.*, 2021). Dentro de esta tecnología, la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) es la más utilizada debido a su capacidad de detectar distintas toxinas de manera simultánea. Esta se basa en la separación de los compuestos en una columna donde el solvente funciona como la fase móvil y la columna como la fase estacionaria. La columna cuenta con partículas de 3-10  $\mu\text{m}$ , lo que permite la separación de compuestos con una gran resolución (Esteo, 2018).

La espectrometría de masas ha permitido disminuir la incertidumbre, permitiendo una detección rápida y eficiente, basada en la ionización de compuestos. Los iones se separan al pasar por campos eléctricos y magnéticos, lo que permite realizar una relación entre su masa y carga e identificar iones pertenecientes a cada compuesto por ejemplo las micotoxinas (Romero *et al.*, 2007).

## **3.2 Aflatoxinas**

### **3.2.1 Género *Aspergillus* y tipos de aflatoxinas**

*Aspergillus* es un género de hongos con gran relevancia económica y social, ya que muchas de sus especies son importantes productoras de aflatoxinas. Éstas son las micotoxinas de mayor importancia, al ser las más tóxicas y cancerígenas entre las que se han identificado hasta el momento (Alves *et al.*, 2019).

El género *Aspergillus* se caracteriza por la presencia de conidióforos, cuyas colonias crecen de manera rápida y con tonalidades blanco, amarillo, marrón, negro o verde (Palacio, 2016). Cuenta con cinco subgéneros, los cuales se subdividen en

16 secciones (Samson *et al.*, 2014). Se han identificado más de 20 especies micotoxigénicas en este género, sin embargo, las de mayor importancia a nivel de seguridad alimentaria son las procedentes de la sección flavi (subgénero *Circunmdati*), las cuales son los principales productores de aflatoxinas (Fisvard *et al.*, 2019).

Los conidióforos de este género, son estructuras unicelulares que se dividen en tres partes: vesícula, estipe, célula pie. Sobre la vesícula se encuentran las células conidiógenas conocidas como fiálides las cuales generan los conidios, estos son esporas de reproducción asexual. En algunas especies, antes de las fiálides, se encuentra una fila de células llamadas métulas, estas células generan una clasificación entre las cabezas conidiales ya que si presenta únicamente la fila de células fiálides se conoce como uniseriada, mientras que si presenta ambas filas se conoce como biseriada (Abarca, 2000)

Las principales aflatoxinas son la B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) y G2 (AFG2). Los nombres de estas toxinas se brindaron con base en la coloración que presentan bajo la luz UV, es decir, las B producen tonalidades azules (Blue), mientras que las G, producen tonos verdes (Green) (Astoreca *et al.*, 2011).

La estructura molecular de las aflatoxinas consiste en un núcleo de cumarina unido a un doble anillo furano y a una pentosa o lactosa para la AFB y AFG respectivamente. El consumo de AFB1 y AFB2 por animales puede ocasionar la hidroxilación del carbono 14 en el hígado, lo que genera la acumulación de aflatoxinas M1 y M2 (AFM1 y AFM2) en la leche (Palacio, 2016).

En la sección flavi se encuentra la mayor cantidad de especies productoras de aflatoxinas, *Aspergillus flavus* es la que presenta mayor importancia debido a que es la principal productora de aflatoxinas B1 (Alves *et al.*, 2019). *A. flavus* es un parásito facultativo, lo que indica que es un hongo de vida principalmente saprófita que participa en el ciclo de la materia orgánica del suelo y en este medio es donde inicia su ciclo de infección en las plantas. Inicialmente los conidios de *A. flavus* que se encuentran en el suelo son dispersados por el viento u otros vectores, como

insectos, lo que les permite colonizar nuevas plantas. Este proceso se ve favorecido cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés (Accinelli *et al.*, 2014).

El ciclo de vida de *A. flavus* se compone de una fase asexual, mediante la dispersión de los conidios, y una fase sexual. Esta última se da mediante la formación de esclerocios, que son estructuras de resistencia producidas como respuesta a condiciones de estrés. Se componen de masas de hifas endurecidas de coloraciones oscuras con células de forma poliédrica. Los esclerocios pueden dar lugar a reproducción asexual cuando germinan y forman nuevas hifas para la producción de nuevos conidióforos o puede llegar a generar reproducción sexual mediante la formación de ascocarpos, los cuales, mediante la fusión de núcleos y posteriormente meiosis forman ascosporas (Luis *et al.*, 2020).

Al ser un hongo habitante de suelo, *A. flavus* es un patógeno común en los cultivos agrícolas, adicionalmente presenta una alta adaptabilidad al sustrato y el ambiente lo que aumenta sus probabilidades de colonización en gran variedad de productos agrícolas, y disminuye su inocuidad. Sin embargo, su crecimiento y desarrollo ocurre principalmente durante el periodo de almacenamiento de los productos a causa de la alta humedad, temperatura y actividad de agua que se presenta, principalmente en granos (Accinelli *et al.*, 2020; Cleveland *et al.*, 2009).

### **3.2.2 Importancia de las aflatoxinas**

Las micotoxinas son conocidas como las sustancias carcinogénicas más potentes conocidas que llegan a producir distintas afecciones tanto en seres humanos como animales. Las enfermedades producidas por estas se conocen como micotoxicosis, en altas concentraciones puede llegar a producir efectos mutagénicos, teratogénicos y altera la respuesta inmune (Bogantes *et al.*, 2004).

Las aflatoxinas son las micotoxinas de mayor importancia a causa de su alta capacidad tóxica. Entre estas la B1 es la que representa un mayor peligro para la salud tanto de seres humanos como de animales, ya que se encuentra estrechamente relacionada con el cáncer de hígado, mutaciones puntuales y

deformidad fetal. La AFB1 es producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*, los cuales producen una contaminación directa de los productos agrícolas, de igual manera pueden generar una contaminación indirecta al contaminar productos que son ingeridos por reses, las cuales por medio de hidroxilación hepática transfieren la toxina a la leche en forma de AFM1 (Pichardo & Elizondo, 2020; Bogantes *et al.*, 2004).

En 1987, las AFB1 y AFM1 se clasificaron como carcinógenos grado 1 por la Agencia Internacional de Investigación en cáncer (IARC) (World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 1993). Además, actualmente, se han realizado distintos estudios en los que se reafirma el potencial cancerígeno de estas moléculas (Misihairabgwi *et al.*, 2019). Por ejemplo, en África se han presentado distintos casos de afectación en seres humanos y animales, uno de estos fue entre 1978 y 2008 en Kenia en donde se reportó la afectación de 317 personas y 125 muertes (Thathana *et al.*, 2017; Ostry *et al.*, 2017).

### **3.2.3 Biosíntesis de aflatoxinas**

La biosíntesis de aflatoxinas es un proceso complejo que involucra 30 genes que se ubican en la región 70 kb del cromosoma 3 y alrededor de 27 reacciones de enzimas las cuales se encuentran reguladas por los genes *afIR* y *afIS*. Estos dos genes son los encargados de iniciar la biosíntesis de aflatoxinas; sin embargo, algunos factores ambientales también pueden influir en su biosíntesis (Caceres *et al.*, 2020).

Estos genes se estudiaron en *A. flavus* y *A. parasiticus* los cuales presentan una alta homología de genes (99%), la principal diferencia entre ambos es debida a que el primero produce aflatoxinas de tipo B, mientras que el segundo puede generar tanto las B como las G (Cáceres *et al.*, 2020). A continuación, se explicará la ruta de biosíntesis de AFB1, ya que esta es la más relevante a nivel mundial, mostrando los principales genes e intermediarios involucrados.

Para la formación de las aflatoxinas se requiere de unidades de hexanoato las cuales se crean a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, el primer paso del proceso requiere de la formación del primer metabolito estable, este es el ácido norsolorínico (NOR). En este primer proceso se ven involucrados los genes *afIA*, *afIB*, *afIC* y *hypC*, los primeros dos genes son encargados de la síntesis de enzimas responsables de la transformación de hexanoato a una estructura policétida, el tercer gen es encargado de la síntesis de la enzima policétido sintasa encargada de alargar las cadenas del policétido, lo cual genera una antrona de ácido norsolorínico (NAA). El último gen sintetiza una enzima de 17 kDa la cual realiza la conversión catalítica de NAA a NOR (Cáceres *et al.*, 2020).

El segundo paso en el proceso de biosíntesis es el paso de NAA a versicolorin A, en este se ven involucrados distintos genes y reacciones. El proceso inicia con la síntesis de la enzima cetoreductasa por parte del gen *afID* la cual hidroxila el grupo cetona lo que genera un nuevo compuesto conocido como averantina (AVN). Posteriormente, se da la formación del compuesto 5'-hidroxiaverantina, el cual es catalizado por una enzima monooxigenasa, esta se genera en respuesta al gen *afIG*, posteriormente el gen *afIH* genera la señal para la síntesis de la enzima alcohol deshidrogenasa la cual ayuda con la conversión de 5'-hidroxiaverantina a 5'-oxoaverantina (Cáceres *et al.*, 2020).

El paso de 5'-oxoaverantina a averufina es catalizado por el gen *afIK*, posteriormente este último compuesto pasa a hidroxiversicolorona, este proceso se da en respuesta al gen *afII* y es catalizado por la enzima monooxigenasa microsomal P-4560 la cual es codificada por el gen *afIV*. Seguidamente, este último compuesto forma hemiacetal versiconal acetato como respuesta al gen *afII* y catalizado por la enzima citosólica monooxigenasa, codificada por el gen *afIW*. El modo de acción del gen *afII* no se encuentra totalmente descrito, sin embargo, se considera que este participa en la oxidación de averufina y en el cierre de anillos para la formación de hidroxiversicolorona (Cáceres *et al.*, 2020). Yu *et al.* (2000) determinaron que al inhibir la expresión de este gen se da una acumulación de averufina.

Posteriormente se da la activación del gen *aflJ* el cual codifica para la enzima esterasa que cataliza la reacción del paso de hemiacetal versiconal acetato a versiconal, este es un proceso reversible, la misma enzima facilita la reacción en cualquiera de los dos sentidos. Posteriormente, la enzima ciclasa, codificada por el gen *aflK*, realiza el cierre de los anillos bifurano para formar el versicolorina B. Posteriormente el gen *aflL* induce la síntesis de una enzima monooxidasa la cual genera el paso de versicolona B a A (Cáceres *et al.*, 2020).

El tercer paso es la conversión de versicolorina A a esterigmatocistina y existen cinco genes involucrados en este paso. Inicialmente se da un paso de versicolona A a demetilsterigmatocistina, en este participan los genes *aflM*, *aflN*, *aflX* y *aflY*, los cuales codifican para las enzimas cetoreductasa, monooxigenasa y oxidorreductas, respectivamente, a excepción de *aflY* el cual interviene en estructuras intermedias. Posteriormente el gen *aflO* induce la síntesis de o-metiltransferasa la cual participa en el paso de demetilsterigmatocistina a esterigmatocistina (Cáceres *et al.*, 2020).

Por último, se da el paso de esterigmatocistina a aflatixona B1, en este proceso intervienen cuatro genes, estos son: *aflP*, *aflQ*, *hypB* y *aflE*. Estos genes codifican para las siguientes enzimas: o-metiltransferasa, monooxigenasa, oxidasa y alcohol deshidrogenasa, respectivamente. Estas enzimas permiten la conversión de esterigmatocistina a aflatixona B1, por medio de 4 moléculas intermedias (Cáceres *et al.*, 2020).

### **3.3 Control de aflatoxinas**

#### **3.3.1 Métodos de control en general**

Las técnicas de manejo de *A. flavus* deben de ser consecuentes con su capacidad de desarrollo y su alta adaptabilidad. No existe un método de que sea efectivo en su totalidad, lo ideal es realizar una combinación de estrategias que asegure que se reduzca la contaminación por el patógeno.

Existen distintos métodos de manejo de aflatoxinas, sin embargo, estos deben ser enfocados principalmente hacia una prevención de la infección de los granos desde el campo por medio de buenas prácticas agrícolas. Para esto se debe conocer cómo se da la infección del hongo, la cual se puede dividir en dos fases. La primera se da durante el desarrollo del cultivo, donde la colonización del hongo sucede principalmente cuando las plantas se encuentran con deficiencias nutricionales o bajo estrés. La segunda se puede presentar durante la poscosecha; en esta fase comúnmente se da un incremento en la temperatura y la humedad, lo que hace que el hongo pase de una fase de crecimiento a producción de micotoxinas (Bandyopadhyay *et al.*, 2016).

Las estrategias de respuesta a la infección del hongo deben enfocarse en: impedir la degradación de la pared celular, evitar brindarle las condiciones ambientales al hongo y prevenir la producción de aflatoxinas. Entre las prácticas de manejo que se pueden aplicar para la reducción de la infección del hongo en la planta se encuentran: monitoreos, destrucción de plantas o granos afectados durante el almacenamiento, secado, clasificación de granos, mantener una nutrición adecuada en la planta, rotación de cultivos, eliminación de residuos orgánicos de la parcela y uso de variedades vegetales resistentes (Bhatnagar *et al.*, 2015; Bandyopadhyay *et al.*, 2016; Misihairabgwi *et al.*, 2019).

Se ha visto que algunas de estas estrategias no presentan una correlación costo beneficio positiva, ya que consumen recursos como mano de obra y tiempo los cuales se pueden perder al presentarse cambios ambientales que incentiven el desarrollo del hongo. Por otra parte, muchas de estas tecnologías no pueden ser aplicadas por todos los productores a causa de su alto costo de adquisición u otros factores, tal es el caso de algunas variedades que han sido mejoradas por medios transgénicos, las cuales no pueden producirse en todos los países debido a regulaciones políticas; adicionalmente, requieren de un gasto de adquisición de semilla en cada ciclo de siembra (Bandyopadhyay *et al.*, 2016).

### 3.3.2 Combate biológico

Entre las metodologías de manejo de *A. flavus*, el combate biológico utilizando cepas no toxigénicas ha presentado reducciones en el contenido de aflatoxinas de 80-95% antes de la cosecha (Kinyungu *et al.*, 2019). Se ha determinado que las cepas no toxigénicas compiten por recursos como nutrientes, espacio, agua o aire cuando se aplica al suelo, lo que conlleva a una disminución de las cepas toxigénicas, lo que genera una reducción en la contaminación del producto final (Mwakinyali *et al.*, 2019).

Actualmente se encuentran en el mercado productos comerciales tales como: Aflaguard®, AF36® registrado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos y Aflasafe® registrado en Nigeria y Kenya. Estas formulaciones son específicas para su uso en la región de la cual se aislaron y parten del supuesto de que las cepas no toxigénicas desplazan a las toxigénicas en campo. Esta metodología tiene sus efectos, tanto positivos como negativos; entre sus beneficios se encuentra su fácil aplicación y costo, además de su alta capacidad de control de aflatoxinas, sin embargo, ambos, tanto las cepas toxigénicas como las no toxigénicas, tienen la capacidad de producir otros metabolitos secundarios (Kagot *et al.*, 2019).

Los posibles efectos negativos que se presentan durante la aplicación de productos de combate biológico se pueden determinar mediante pruebas de evaluación de riesgos, las cuales se centran en sus efectos, así como la revisión de las posibles toxinas que estas produzcan. Otra posibilidad es la compatibilidad sexual entre las cepas toxigénicas y las no toxigénicas, en caso de que estas puedan entrecruzarse, de forma que la toxicidad puede transferirse a la progenie, este efecto se minimiza mediante pruebas de compatibilidad en laboratorio (Kagot *et al.*, 2019).

La selección de cepas como agentes biológicos para el desarrollo de productos comerciales, se basa inicialmente en la procedencia de estas, es importante que sean de la región o país de producción, ya que estas se encuentran

adaptadas a las condiciones ambientales, adicionalmente se busca no ingresar nuevos agentes a los distintos ecosistemas (Kagot *et al.*, 2019).

Para la selección de las cepas se utilizan técnicas moleculares que permiten determinar si los hongos presentan los genes de la ruta de biosíntesis de aflatoxinas (Wei *et al.*, 2014). La delección de cualquiera de los genes de la región 70 kb del cromosoma 3, genera una cepa no toxigénica, el proceso de delección del gen no se encuentra del todo caracterizado; sin embargo, es un mecanismo eficaz para la detección de cepas no toxigénicas, mediante la utilización de PCR y su amplificación o la ausencia de esta (Rao *et al.*, 2020).

Wei *et al.* (2014) identificaron cuatro genes que se presentaban más frecuentemente cuando una cepa era no toxigénica. El primero es el gen *afIT*, este codifica para una enzima encargada de la secreción de aflatoxinas, el segundo es el gen *HypB* del cual no se conoce del todo su funcionamiento, sin embargo, se considera que participa en la oxidación para pasar de o-metilesterigmatocistina a aflatoxina. El tercero es el gen *Nor-1* también conocido como *afID* este codifica para una cetoreductasa la cual participa en el paso de ácido norsolorinico a averantina. El cuarto es el gen *afIR* este es un regulador de la síntesis de aflatoxinas.

### **3.4 Generalidades de los cultivos de maní y frijol**

#### **3.4.1 Frijol**

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa destinada al consumo humano de mayor producción a nivel mundial, presenta gran importancia para el desarrollo agropecuario, así como para la dieta de diversas regiones en el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo, ya que cuenta con altos contenidos nutricionales, siendo fuente de proteína, vitaminas, fibra dietética, hierro, calcio, potasio y fósforo (Hernández, 2009).

Este grano es una planta herbácea que pertenece a la familia Fabaceae, en el 2017 se produjo 31.4 millones de toneladas a nivel mundial de frijol seco en un

área de 3.6 millones de hectáreas (Kul *et al.*, 2019). La principal región consumidora de este grano se encuentra en Hispanoamérica, según la FAO el consumo per cápita en Nicaragua es de 20 Kg, en Brasil de 16,1 Kg; mientras que, en países desarrollados es inferior a 1 Kg (Beebe *et al.*, 2017).

En Costa Rica, históricamente la región socioeconómica de mayor producción de frijol ha sido la Huetar Norte, sin embargo, a causa del huracán Otto en el 2017 y la tormenta Nate en el 2018, la producción en esta zona se vio reducida. Por lo que, a partir del 2017 la Región Brunca ha sido donde se encuentra la mayor producción de frijol a nivel nacional, llegando a un 51% entre el año 2018 y 2019. Sin embargo, esta región también se ha visto afectada por fenómenos climáticos, por lo que la producción a nivel nacional ha disminuido, pasando de 14618 ton entre los años 2011 y 2012 a 9510 ton entre los años 2018 y 2019 (Valerín, S.F).

Este grano no es reportado en la literatura como un producto comúnmente afectado por *Aspergillus* spp., sin embargo, se han presentado reportes en distintas partes del mundo con productos contaminados por este hongo, tal es el caso de Brasil donde se identificaron distintas cepas de hongos del género *Aspergillus* (Alves *et al.*, 2019).

### **3.4.2 Maní**

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es una planta herbácea, producida en distintas partes del mundo siendo China, India, Nigeria, Estados Unidos y Myanmar los principales productores. Su fruto presenta altos contenidos de vitamina E, polifenoles con capacidad antioxidante, adicionalmente contiene calcio y ácidos grasos omega 9 (Ministerio de Agroindustria, 2018). Entre las semillas oleaginosas, el maní es el más susceptible al ataque de hongos, siendo reportado como uno de los productos agrícolas más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas (Pérez *et al.*, 2007; Granados *et al.*, 2017).

La producción de maní en Costa Rica es baja, a pesar de tener las condiciones climáticas necesarias. El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG)

reporta que en Costa Rica únicamente se dedican 50 hectáreas a la producción de este grano obteniendo una producción anual de 138 000 Kg (Marín, 2016).

#### **4. Justificación**

El frijol es un producto de alto consumo entre los costarricenses, siendo parte de la dieta básica, sin embargo, este grano es susceptible a la contaminación por micotoxinas, especialmente aflatoxinas. En el caso del maní, la producción a nivel nacional es baja, sin embargo, es también un producto agrícola susceptible a la contaminación por aflatoxinas.

La presencia de aflatoxinas en productos para consumo humano y animal puede generar pérdida o deterioro de vidas humanas y animales. Además, repercute en la economía, ya que se da un incremento en los gastos médicos y veterinarios, además de, bajas en la producción animal y pérdida de cosechas por contaminación. Costa Rica, al ser un país del trópico, presenta condiciones ideales para el desarrollo de hongos micotoxigénicos.

Hasta este momento, en Costa Rica no se cuenta con información respecto a las especies de *Aspergillus* micotoxigénicas presentes en los granos que se producen a nivel local, por lo cual resulta difícil dimensionar el impacto que estas tienen en productos agrícolas como maní y frijol. Por otra parte, a pesar de la legislación nacional relacionada con los límites máximos permitidos de aflatoxinas en granos como el frijol y el maní, estas no se regulan en granos producidos a nivel nacional posiblemente por un desconocimiento general de las autoridades sobre la situación de la problemática de las micotoxinas.

Es de gran importancia implementar medidas de control para mitigar el efecto que los hongos micotoxigénicos puedan llegar a tener sobre la salud humana y animal, en especial en especies de gran importancia como *A. flavus*. Una de las medidas de control con una alta eficiencia reportada en cuanto al manejo por micotoxinas desde el campo son los controladores biológicos utilizando cepas no

toxigénicas de *A. flavus*. Sin embargo, en el país no se cuenta con la información necesaria para implementar esta medida de control para hongos micotoxigénicos, ya que se requieren de cepas adaptadas a las condiciones agroclimáticas del país. De aquí la importancia de generar información sobre la presencia de organismos no toxigénicos en productos agrícolas susceptibles a las aflatoxinas como el frijol o el maní.

## **Objetivos**

### General:

- Identificar las especies de *Aspergillus* asociadas a maní y frijol costarricense y determinar su capacidad toxigénica.

### Específicos:

- Identificar por métodos morfológicos y moleculares las especies de *Aspergillus* spp. previamente aisladas de maní y frijol.
- Analizar la capacidad toxigénica de especies de *Aspergillus flavus* mediante cultivos controlados en maní y frijol.
- Identificar los aislamientos no toxigénicos de *Aspergillus flavus* mediante métodos moleculares.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Sitio experimental

El proyecto se llevó a cabo en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio en San Pedro, Montes de Oca.

### 5.2 Material vegetal

Se recolectaron 83 muestras de frijol y 19 de maní sin pelar, ambos procedentes de cinco regiones productoras del país (Cuadro 1) durante los años 2019 y 2020. Estas permanecieron almacenadas en una cámara fría a 5°C, por un máximo de 2 meses, hasta realizar los respectivos aislamientos. La información y lista de muestras de frijol y maní se presenta en el anexo 4 y 5, respectivamente.

Cuadro 1. Número de muestras colectadas en cinco regiones productoras de frijol y maní de Costa Rica durante los años 2019 y el 2020.

Región socioeconómica	Número de muestras				
	Frijol				Maní
	Blanco	Mantequilla	Rojo	Negro	
Brunca	0	1	30	27	0
Pacífico Central	1	1	4	3	0
Central	0	0	6	6	11
Chorotega	0	0	4	0	2
Huetar Norte	0	0	0	0	6
Total de muestras	83				19

### 5.3 Aislamiento de *Aspergillus* a partir de granos de frijol y maní

Se colocaron 10 g de granos de frijol en un beaker, los cuales se llevaron a una cámara de bioseguridad, posteriormente se les realizó tres lavados agregando agua destilada autoclavada hasta que se cubriera la muestra. En el caso de las muestras de maní, estas se encontraban con cáscara, por lo que se pesaron 20 g

de las muestras y se pelaron dentro de la cámara de bioseguridad antes de realizar los lavados.

Seguidamente, los granos se colocaron en placas Petri con 20 g/L de medio agar-malta (20 g/L de agar bacteriológico marca, OXOID® y 20 g/L de extracto de malta marca Becton Dickinson and Company). Se colocaron cinco granos por cada placa y se realizaron seis repeticiones por muestra recolectada.

Las placas se incubaron a 30 °C por tres días en oscuridad. Una vez que se observó crecimiento de micelio (Figura 6A), se tomó una pequeña sección del mismo con un asa de Kohle y se colocó en el centro de la placa de Petri con medio Czapek extracto de levadura (CYA25) (50,01 g/l, Dox Agar, pH 8,2, PhytoTechnology Laboratories®). Las placas se incubaron a 30°C por 7 días, en oscuridad.

Posteriormente, los hongos se identificaron a nivel de género mediante la visualización al microscopio de los microconidios, de acuerdo a la descripción de Klich (2002) (Figura 6B). Los aislamientos identificados como *Aspergillus* fueron utilizados para realizar los cultivos monospóricos. Para esto, se tomaron discos de micelio y se introdujeron en un tubo Eppendorf con agua de tubo autoclavada. Se agitaron vigorosamente con un vortex por 10s para liberar los microconidios, de esta solución se tomaron 10 µl, para contar las esporas en una cámara Neubauer (Improved Neubauer, Bright-line, profundidad 0,100 mm +/- 2%, volumen 0,1 µl, Boeco, Germany). Luego la muestra se diluyó hasta obtener una concentración de 30 esporas en 50 µl.

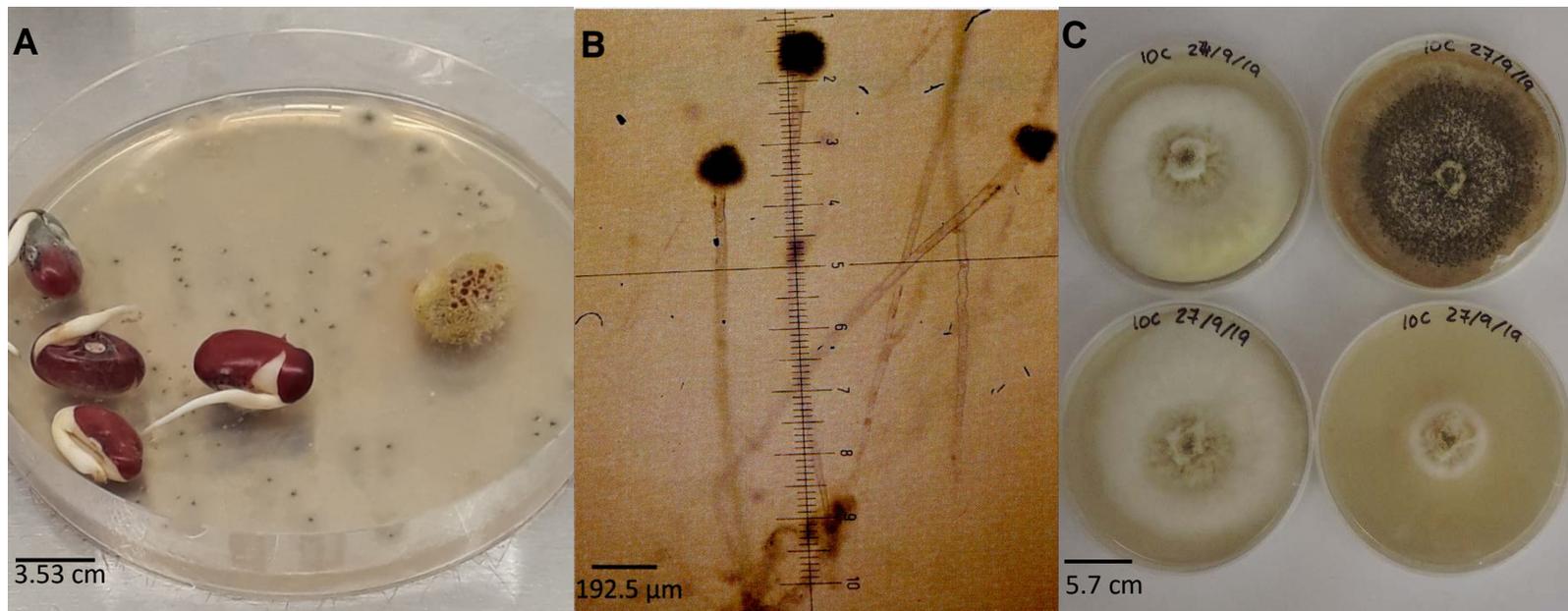


Figura 1. (A)Crecimiento de micelio en granos de frijol rojo, (B) microconidios observados al microscopio característicos del género *Aspergillus*, (C) micelio obtenido a partir de cada aislamiento monospórico creciendo en medio CYA25 luego de 7 días de cultivo.

De esta dilución se tomaron 100  $\mu$ l, los cuales se colocaron en el centro de dos placas Petri con medio agar-malta, utilizando 50  $\mu$ l en cada placa, esto se dispersó por la placa con ayuda de una espátula de Drigalsky y se incubaron por un 1 día a 30°C. Luego se tomaron dos microcolonias por placa y cada uno se colocó en el centro de una nueva placa Petri, en medio CYA25. Las microcolonias se incubaron durante 7 días a 30°C (Figura 6C).

Con el fin de conservar el micelio de cada cultivo monospórico, se almacenó micelio proveniente de al menos dos microcolonias, de cada una de estas se realizaron dos réplicas. Para eso, se extrajeron ocho discos por placa de Petri, con ayuda de una pajilla plástica previamente esterilizada, se almacenaron en tubos Eppendorf con 1 ml de glicerol al 10% a -80°C.

#### 5.4 Identificación de las especies de *Aspergillus* aisladas de maní y frijol.

La identificación a nivel de especie de los aislamientos de *Aspergillus* se realizó solamente mediante métodos moleculares, ya que, la identificación morfológica es un procedimiento largo y complejo que requiere del crecimiento de las colonias en distintos medios de cultivo; por lo que la opción de realizarlo a nivel molecular permitió agilizar el proceso.

La extracción de ADN se realizó utilizando micelio de los cultivos monospóricos aislados y almacenados a -80°C. Para obtener suficiente micelio, primero se colocó 4 µl de la solución de esporas en placas Petri con medio CYA25 durante 7 días a 30°C. El micelio obtenido se extrajo de cada placa realizando un leve raspado y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml. Luego, el micelio se liofilizó durante tres días, utilizando un liofilizador (Martin Christ Alpha, Alemania). La extracción de ADN se realizó basado en el protocolo descrito por Brandfass y Karlovsky (2008) utilizando 2 mg de micelio liofilizado.

La calidad del ADN se determinó por medio de dos métodos: inicialmente se realizó una electroforesis de las muestras durante 1 hora a 100 V, seguidamente por medio de un nanofotómetro (Pearl; Munich, Alemania) se determinó su relación 260/280, así como su concentración.

Para cada muestra de ADN se realizó la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) en tiempo final utilizando un termociclador Eppendorf flexlid (Mastercycler nexus gradient, Hamburgo). Se amplificó la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) utilizando los imprimadores ITS1 e ITS4 (Samson *et al.*, 2014), que genera un amplicón de 700 pb. Los componentes y la concentración de los reactivos utilizados para la reacción del PCR se presentan en el anexo 1, mientras que el perfil térmico para la PCR se presenta en el anexo 2. La secuencia de los imprimadores utilizados se presenta a continuación:

- ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3'

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Bioedit (Hall *et al.*, 1999) y las especies se identificaron por homología comparando con las secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) (Samson *et al.*, 2014), utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLASTN).

### 5.5 Identificación de los aislamientos de *Aspergillus* no toxigénicos.

Con el fin de realizar una selección inicial, se realizó un PCR en tiempo final, solamente con los aislamientos identificados como *A. flavus*, con el fin de determinar si presentaban algunos de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de las aflatoxinas. El PCR se realizó utilizando un termociclador Eppendorf Flexlid (Mastercycler nexus gradient, Hamburgo). Las condiciones de la reacción se presentan en el anexo 1, mientras que, el perfil térmico del PCR se muestra en el anexo 3. Se utilizaron los siguientes imprimadores (Wei *et al.*, 2014):

- aflT\_F (5'ATGACATGCTAATCGACGAG3') y aflT\_R (5' AGGCGCATGCTACGGATC 3')
- nor1\_F (5' AGCACGATCAAGAGAGGCTC3') y nor1\_R (5' GATCTCAACTCCCCTGGTAG 3')
- aflR\_F (5'ATGGTCGTCCTTATCGTTCTC3') y aflR\_R (5' CCATGACAAAGACGGATCC 3')
- hypB\_F (5'GTTCGGTTATGCCCAAGGT3') y hypB\_R (5' CAGCCAACGGAAAGAGTGC 3')

Los imprimadores utilizados son parte de los 30 genes involucrados en la ruta de biosíntesis de aflatoxinas ubicados en la región 70 kb del cromosoma 3. Wei *et al.*, (2014) mencionan que los genes *aflR*, *aflT*, *hypB* y *nor-1* son los que presentan la mayor frecuencia de deleción entre aislamientos no toxigénicos, por esto fueron seleccionados como indicadores de toxicidad. Para cada gen se realizó un gradiente de temperatura para determinar la indicada para la fase de anillamiento, tomando como referencia el ADN de un aislamiento de *A. flavus* toxigénico. En este proceso

se observó que los imprimadores para los genes *nor1* y *hypB* no amplificaron, este problema se presentó en distintas muestras de ADN de *A. flavus* toxigénicos, por lo que esos imprimadores no se tomaron en cuenta para la siguiente etapa del proceso.

## **5.6 Determinación de la capacidad toxigénica de los aislamientos.**

Con el fin de corroborar la no toxicidad de los aislamientos, se realizaron inoculaciones controladas en los granos y un posterior análisis de micotoxinas. Se tomaron 20 g de grano molido de frijol o maní comercial, se colocó en frascos de licuadora de 300 ml y se agregó 50 ml de agua destilada. Seguidamente, se desinfectaron mediante autoclavado a 121 °C por 25 minutos. Posteriormente, cuando los frascos alcanzaron temperatura ambiente, se agregó 2 ml de la solución de esporas (500 esporas/ml), y se incubaron por 2 semanas a 30°C. El control consistió en 2 ml de agua de tubo autoclavada. Se realizaron cinco repeticiones de cada aislamiento no toxigénico.

La extracción de micotoxinas se realizó siguiendo el protocolo establecido por el CIGRAS. Inicialmente a cada muestra de granos se le agregó 100 ml de una mezcla de metanol, agua y ácido fórmico (79:20:1) y se licuó usando una licuadora común por 5 minutos. Se dejó reposar por 15 minutos y se extrajo 25 ml del sobrenadante el cual se colocó en un tubo Falcon de 50 ml y se le agregó cuatro gramos de MgSO<sub>4</sub> anhidro. Esto se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5415 R; Hamburgo, Alemania) a 1810 RCF durante 5 minutos a 10°C y 10 ml del sobrenadante se colocó en un tubo de ensayo, al cual se le añadió 10 ml de agua ultra pura y se agitó en vortex por 30 segundos. Finalmente, el extracto se filtró con un filtro de microfibra (VICAM, Suecia) y luego en un filtro de 0,2 µm (Agilent Captiva, Estados Unidos). El filtrado se colectó en viales ámbar (Thermo Scientific, Estados Unidos) de 1,5 ml para HPLC.

Las micotoxinas se identificaron y cuantificaron por medio de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento Acoplada a Masas (HPLC-MS/MS) (HPLC de ThermoFisher Scientific Dionex ultimate, Germiring, Alemania; espectrómetro de

masas de la marca ThermoFisher TSQ Edura; California, Estados Unidos) usando una columna C18 (AccucoreAQ 100 x 2.1 mm, 2.6 µm tamaño de partícula, Thermofisher) y el siguiente gradiente del solvente A (agua/metanol/ácido fórmico 97:2:1): este inició con un contenido del 95%, luego disminuyó gradualmente hasta el minuto ocho a un 0% del solvente A y 100% del solvente B el cual contenía metanol/agua/ácido fórmico (97:2:1). Entre los minutos ocho y diez se incrementó el contenido del solvente A hasta llegar a un 95%, desde el minuto diez al once se mantuvo un flujo constante con un contenido del 95%.

La detección en el espectrómetro de masas se realizó en modo positivo mediante rango específico de escaneo de masas para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Cuadro 2), con un límite de detección de 1.1 µg/Kg, 2.7 µg/Kg, 2.5 µg/Kg, 2.8 µg/Kg

Cuadro 2. Condiciones para la detección de iones mediante rango específico de escaneo de masas durante el análisis de micotoxinas con HPLC-MS/MS.

Micotoxina	Tiempo Retención (min)	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)
Aflatoxina B1	5,47	313 [M+H] <sup>+</sup>	285;241;269
Aflatoxina B2	5,32	315 [M+H] <sup>+</sup>	287;259;243
Aflatoxina G1	5,13	329 [M+H] <sup>+</sup>	243,,215;283
Aflatoxina G2	4,97	331 [M+H] <sup>+</sup>	245;247;285
Fumonisina B1	6,38	772 [M+H] <sup>+</sup>	334;352;370
Toxina T-2	6,72	489 [M+H] <sup>+</sup>	245;327;387
Zearalenona	7,01	319 [M+H] <sup>+</sup>	283; 301;187
Ochratoxina A	7,12	404 [M+H] <sup>+</sup>	239;358;221

## 5.7 Análisis estadístico.

La determinación de la capacidad toxigénica se determinó en 5 repeticiones por aislamiento de *A. flavus*, con los datos obtenidos del contenido de micotoxinas se realizó una prueba DGC para determinar las diferencias significativas (p<0,05) en la cantidad de toxina producida por cada aislamiento.

## 6. Resultados

### 6.1 Aislamiento de *Aspergillus* a partir de granos de frijol

Se analizaron 83 muestras de granos de frijol provenientes de cinco regiones socioeconómicas de Costa Rica, 45 no presentaron contaminación por individuos del género *Aspergillus*, lo cual representa un 54% del total. Sin embargo, presentaban contaminación por *Fusarium* y *Penicillium*.

Un total de 38 muestras mostraron crecimiento del género *Aspergillus*, lo cual representa un 46% del total. En la figura 2 se muestra el porcentaje de muestras de frijol que presentaron contaminación con *Aspergillus*. En esta figura se muestra que de la Región Brunca se obtuvieron 30 muestras contaminadas con *Aspergillus* spp., lo cual representa un 36% de las 83 muestras recolectadas. La segunda región con la mayor cantidad de muestras con presencia de *Aspergillus* spp. fue la Región Central, de la cual se obtuvo cuatro muestras contaminadas, es decir, un 5% del total de muestras. Las regiones con la menor presencia de *Aspergillus* spp. en granos de frijol fueron la Región Chorotega y Pacífico Central, estas presentaron solamente una y tres muestras contaminadas, respectivamente. Cabe resaltar que en las Regiones Brunca y Central se recolectó la mayor cantidad de muestras de granos de frijol.

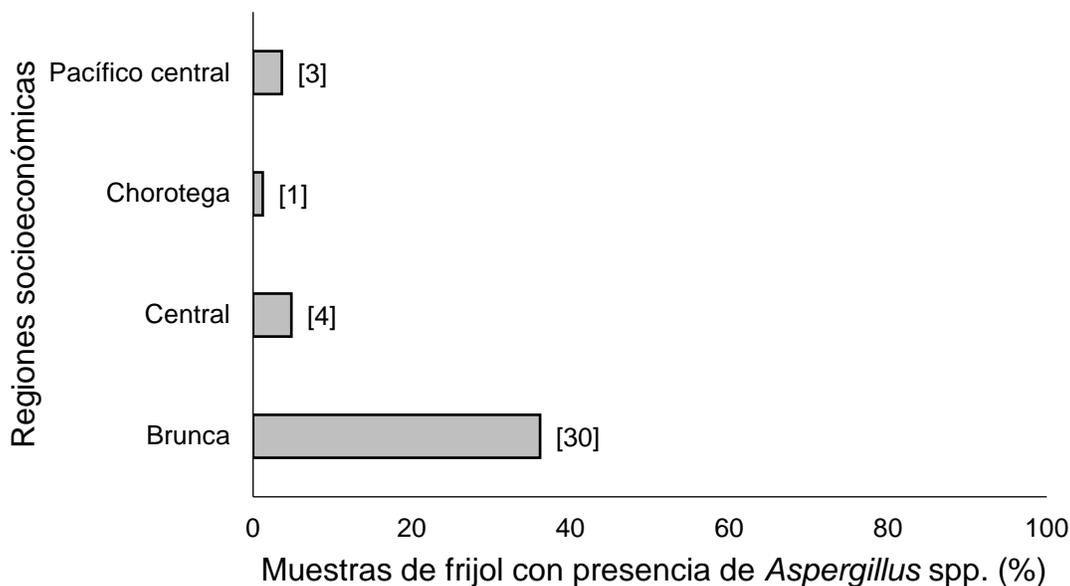


Figura 2. Porcentaje de muestras de frijol que presentaron contaminación con *Aspergillus* spp. según la región socioeconómica de Costa Rica donde se recolectaron. El número entre paréntesis cuadrado en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 83 muestras con *Aspergillus* spp.

Se realizó un análisis de la contaminación por *Aspergillus* spp. por tipo de frijol, en donde se observó una diferencia considerable entre el frijol negro y rojo en comparación con el blanco y mantequilla. El tipo de frijol que presentó la mayor contaminación por *Aspergillus* spp. fue el frijol negro. En este se obtuvieron 19 muestras contaminadas, lo que representa un 23% de las 83 evaluadas (Figura 3).

En frijol rojo se presentaron 16 muestras contaminadas por *Aspergillus* spp., lo cual representa un 19% del total de muestras evaluadas, mientras que en frijol blanco y mantequilla se presentaron una y dos muestras contaminadas, respectivamente (Figura 3).

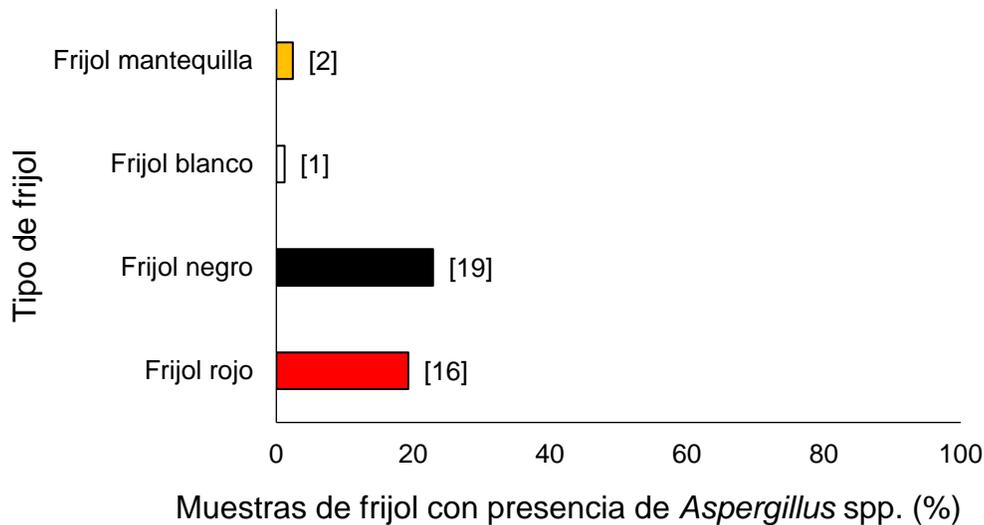


Figura 3. Porcentaje de muestras que presentaron contaminación con *Aspergillus* spp. según el tipo de frijol (mantequilla, blanco, negro y rojo). El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 83 muestras.

A partir de las muestras recolectadas se realizaron aislamientos de *Aspergillus* spp., los cuales fueron clasificados inicialmente a nivel de género por métodos morfológicos y posteriormente a nivel de especie por métodos moleculares. Se identificaron 159 aislamientos como *Aspergillus*, la identificación de las especies se muestra en el anexo 6. Del total de aislamientos, 83 fueron identificados como *A. flavus* lo cual representa un 52% del total de los aislamientos.

En la figura 4 se muestra la distribución que tuvieron los 159 aislamientos entre los tipos de frijol, separándolos entre *A. flavus* y *Aspergillus* spp. El mayor porcentaje de muestras de *A. flavus* se presentó en el frijol negro, llegando a un 24% del total de los aislamientos, mientras que en frijol rojo se presentó un 20%.

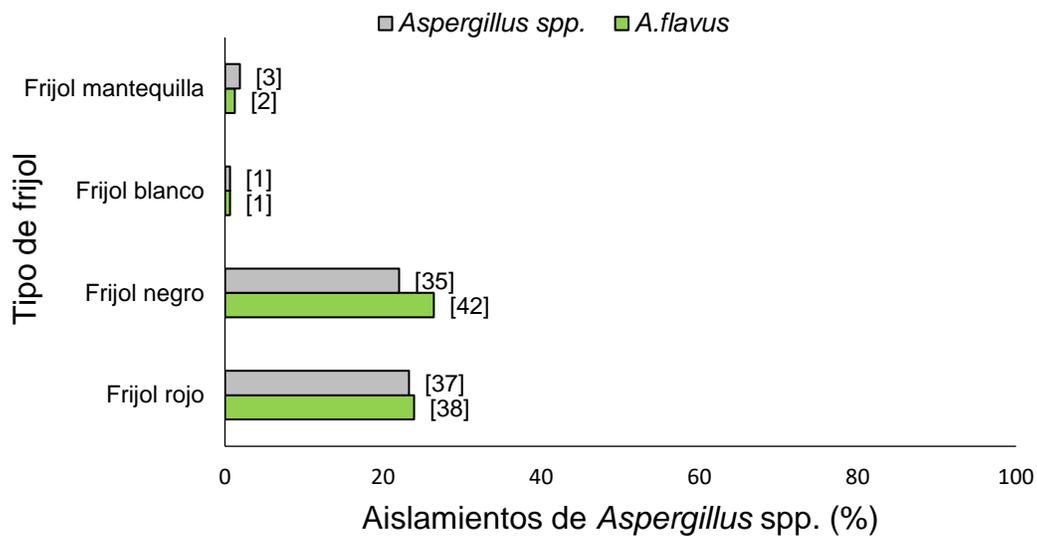


Figura 4. Porcentaje de aislamientos fúngicos de *Aspergillus flavus* y otras especies de *Aspergillus* en muestras de frijol mantequilla, blanco, negro y rojo. El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 159 aislamientos de *Aspergillus spp.*

En el cuadro 3 se muestra la presencia de otras especies de *Aspergillus* en los diferentes tipos de frijol, cabe resaltar que *A. niger* fue la segunda especie de *Aspergillus* que se presentó en un mayor porcentaje (34% del total de aislamientos). En frijol rojo y negro se presentó una mayor variabilidad de especies en comparación con el blanco y mantequilla. En estos últimos, se presentó únicamente *A. niger*.

Cuadro 3. Porcentaje de especies de *Aspergillus* identificadas en frijol rojo, negro, blanco y mantequilla. Entre paréntesis, cuadrados se muestra el número de aislamientos que representa cada porcentaje. Número de muestras total: 159 aislamientos de *Aspergillus* spp.

Especie	Porcentaje de aislamientos [número]			
	Frijol Rojo	Frijol Negro	Frijol Blanco	Frijol Mantequilla
<i>A. aculeatinus</i>	2 [3]	3 [4]	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	-	1[2]	-	-
<i>A. fischeri</i>	-	2 [3]	-	-
<i>A. japonicus</i>	1[2]	-	-	-
<i>A. niger</i>	17 [27]	14 [23]	2 [3]	1[1]
<i>A. oryzae</i>	2[3]	1[2]	-	-
<i>A. tamaritii</i>	1[1]	-	-	-
<i>A. tubingensis</i>	1 [1]	1[1]	-	-

Se seleccionaron los 83 aislamientos de *A. flavus* para realizar un PCR amplificando los genes *afIT* y *afIR*, relacionados con la biosíntesis de aflatoxinas, con el fin de realizar una identificación preliminar de las muestras no toxigénicas. La selección se realizó por medio de una electroforesis, se escogieron únicamente los aislamientos que no amplificaron en ambos genes. En este proceso se preseleccionaron 30 aislamientos como posibles cepas no toxigénicas.

En la figura 5 se muestra un ejemplo de las electroforesis utilizadas para la preselección de las muestras no toxigénicas, en esta se puede observar cómo los aislamientos 40B3, 49B4, 54A2, 54B2, 54C2, 57A1 y 57C2 amplificaron en ambos genes por lo que se consideraron como toxigénicos. Por otra parte, el aislamiento 54C1 amplificó únicamente en el gen *afIR*, sin embargo, se consideró como tóxico, ya que amplificó uno de los genes. Por su parte, las muestras 57D1, 57D2 y 58B2 se clasificaron como no toxigénicas ya que no amplificaron ninguno de los dos genes.

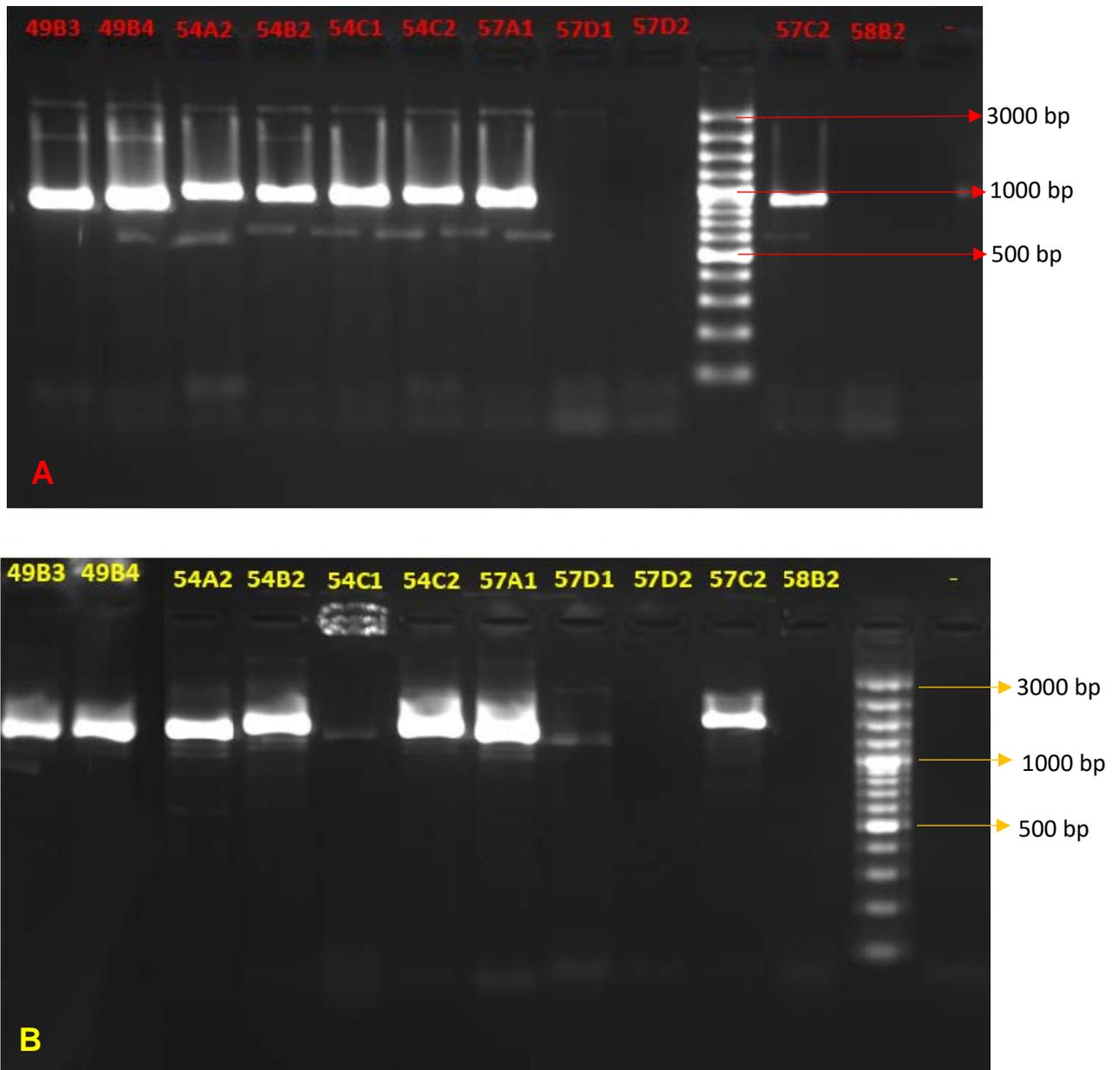


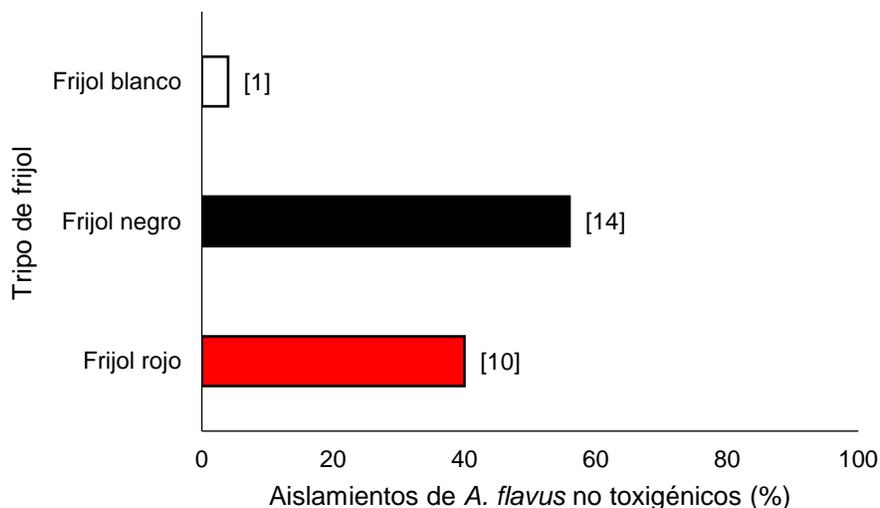
Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos usando ADN de muestras de *Aspergillus flavus* para amplificar los genes *aflR* (A) y *aflT* (B).

Con el fin de corroborar la no toxicidad de los aislamientos de *A. flavus* preliminarmente identificados mediante pruebas moleculares, se inocularon granos de frijol molido, utilizando como matriz el tipo de frijol del que es procedente el aislamiento. Los frijoles inoculados se incubaron por dos semanas a 30°C. Una vez finalizado el periodo de incubación se realizó una extracción de micotoxinas para

ser analizadas mediante HPLC-MS/MS, con el fin de verificar la toxicidad de las muestras preseleccionadas.

Al finalizar ambos procesos, se determinó que 25 aislamientos de los 83 identificados como *A. flavus* son no toxigénicos. Se descartaron 5 aislamientos que fueron seleccionados en la amplificación de genes, ya que se determinó que sí producían toxinas, principalmente aflatoxina B1 (AFB1).

En la figura 6 se muestra la distribución de los aislamientos no toxigénicos entre los tipos de frijol analizados, el porcentaje se determinó según el total de aislamientos identificados como *A. flavus*. Se muestra como los granos de frijol negro fueron los que presentaron la mayor cantidad de aislamientos no toxigénicos, seguido por los granos de frijol rojo. Solamente se obtuvo un aislamiento no toxigénico de frijol blanco y ninguno de frijol mantequilla.



**Figura 6.** Porcentaje de aislamientos no toxigénicos de *Aspergillus flavus* en granos de frijol blanco, negro y rojo. El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 83 aislamientos de *Aspergillus flavus*.

La distribución de los aislamientos no toxigénicos según las regiones socioeconómicas (Figura 7), muestra que los aislamientos obtenidos a partir de frijol negro se ubican principalmente en la Región Brunca, mientras que en la Región Central se identificaron únicamente dos. Por su parte los aislamientos identificados en granos de frijol rojo presentaron una mayor variación entre regiones, ya que se identificaron en la Región Central, Chorotega y Brunca, siendo esta última en la que se ubicó la mayoría de los aislamientos. En frijol blanco se identificó sólo un aislamiento no toxigénico, procedente de la Región Pacífico Central.

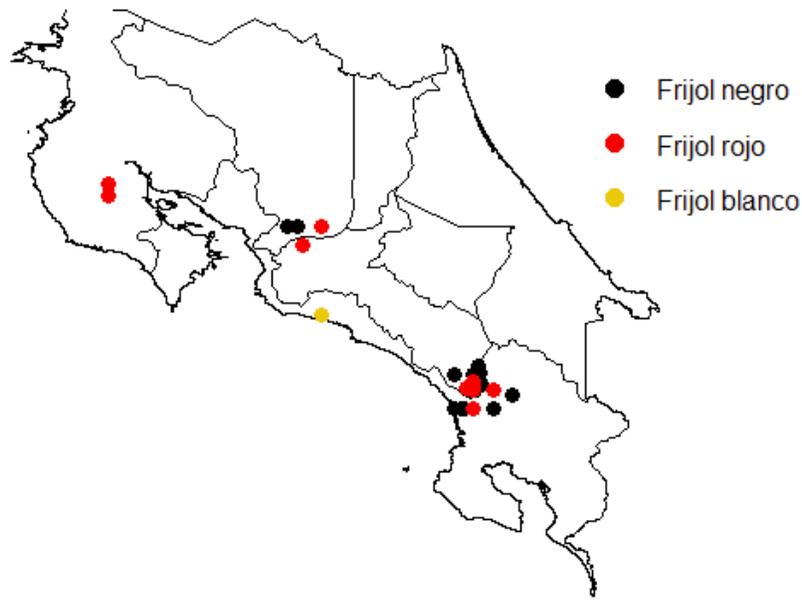


Figura 7. Distribución de aislamientos no toxigénicos de *Aspergillus flavus* según las regiones donde se recolectaron las muestras de frijol negro, rojo o blanco. Cada punto en el mapa representa un aislamiento, el color de cada punto identifica el tipo de frijol del cual procede el aislamiento.

El contenido de aflatoxina B1 (AFB1) que produjeron los cinco aislamientos de *A. flavus* que fueron identificados como toxigénicos, además de dos controles positivos: 6A2 en frijol negro y 71A1 en frijol rojo; sobrepaso tanto el límite máximo de detección como el de cuantificación los cuales son de 1.1 ug/Kg y 3.6 ug/Kg respectivamente, llegando hasta 3571.43 ug/Kg en el caso de la muestra 71A1, la micotoxina más tóxica desde el punto de vista de salud pública. La aflatoxina B2 (AFB2) fue identificada en las muestras 13A1 y 71A1 en concentraciones de 43.7 ug/Kg y 27.08 ug/Kg respectivamente (Figura 8).

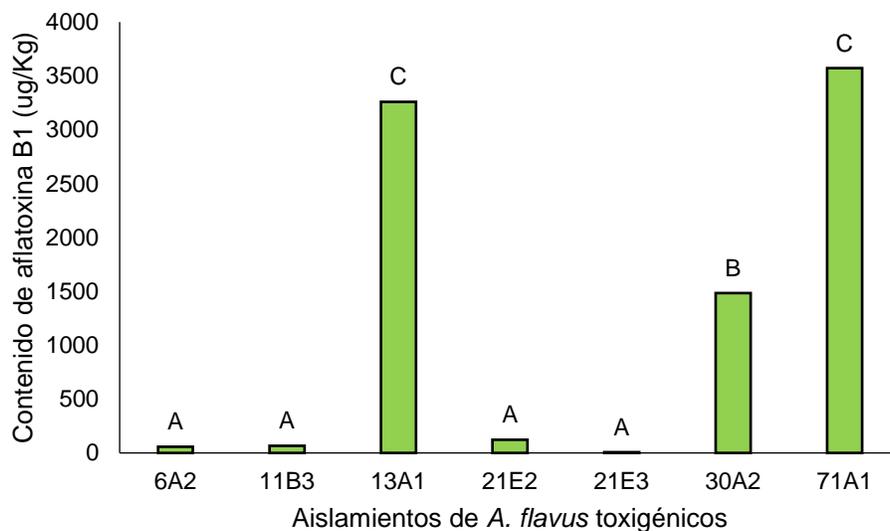


Figura 8. Concentración de aflatoxina B1 producida por aislamientos toxigénicos de *Aspergillus flavus* en granos de frijol negro (6A2, 11B3, 13A1, 21E2, 30A2) y rojo (71A1). Letras diferentes sobre cada barra indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada aislamiento según prueba DGC como método estadístico.

## 6.2 Aislamiento de *Aspergillus* spp. en maní

En maní se recolectaron 19 muestras de las cuales un 68% no presentaron contaminación por *Aspergillus* sp. La mayoría de las muestras contaminadas se presentaron en la Región Central, esto representó un 16% del total de muestras, mientras que la Región Chorotega presentó el menor porcentaje de muestras contaminadas con un 5% del total de muestras (Figura 9).

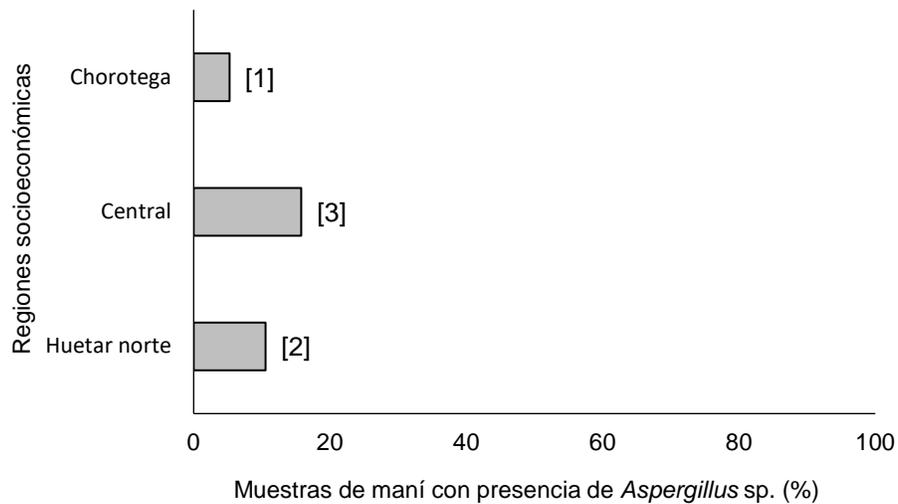


Figura 9. Porcentaje de aislamientos fúngicos identificados como *Aspergillus* spp. por Región Socioeconómica de Costa Rica en granos de maní. El número entre paréntesis cuadrados en cada barra corresponde a la cantidad de muestras a las que hace referencia el porcentaje. Número de muestras total: 19 muestras con *Aspergillus* spp.

Se obtuvo un total de 24 aislamientos de *Aspergillus* spp. en maní, la identificación a nivel de especie se muestra en el anexo 7. Del total de aislamientos, solamente uno fue identificado como *A. flavus*, la especie que se presentó con mayor frecuencia fue *A. niger* llegando a un 71% del total de los aislamientos (cuadro 4).

Se realizó un PCR con ADN del aislamiento identificado como *A. flavus* para amplificar los genes relacionados con la ruta de biosíntesis de las aflatoxinas (*afIR* y *afIT*). Para realizar una identificación preliminar respecto a la toxicidad del hongo, se realizó mediante la selección de muestras con una electroforesis, en donde se determinó que ningún aislamiento en maní fue no toxigénico (Figura 10).

Cuadro 4. Porcentaje de aislamientos de *Aspergillus* provenientes de maní identificados según especie. Entre paréntesis, cuadrados se muestra la cantidad de muestras que representa cada porcentaje. Número de muestras total: 24 aislamientos de *Aspergillus* spp.

Especie	Porcentaje de aislamientos [número]
<i>A. flavus</i>	4 [1]
<i>A. melleus</i>	13 [3]
<i>A. niger</i>	71 [17]
<i>A. tamarii</i>	8 [2]
<i>A. terreus</i>	4 [1]

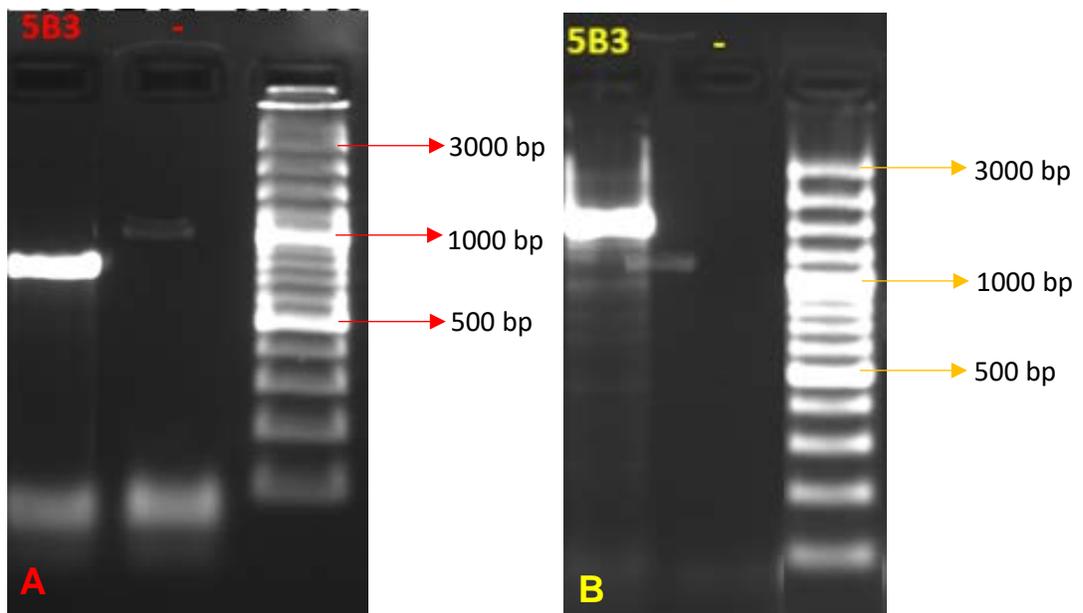


Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos usando ADN de muestras de *Aspergillus flavus* para amplificar los genes *aflR* (A) y *aflT* (B).

## 7. Discusión

### 7.1 Identificación de *Aspergillus* spp. en granos de frijol y maní

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos, principalmente los procedentes de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Este último es el que presenta un mayor impacto tanto a nivel de inocuidad de los alimentos como en repercusiones económicas (Alves *et al.*, 2019; Granados *et al.*, 2017). Esta investigación se centró en el género *Aspergillus* a causa de la relevancia en cuanto al impacto que produce en la salud del consumidor. Se evaluó la presencia de hongos del género *Aspergillus* en muestras de granos de maní y frijol, recolectadas de distintas regiones socioeconómicas de Costa Rica.

El frijol fue el que presentó la mayor cantidad de muestras contaminadas, entre ambos cultivos se dio una diferencia de un 14%. Este es un resultado no esperado, ya que el maní es uno de los sustratos más comunes para el crecimiento de *Aspergillus* spp., así como para que este produzca aflatoxinas (Granados *et al.*, 2017). Cabe resaltar que se contaba con una mayor cantidad de muestras en frijol, lo cual es una variable relevante a tomar en cuenta, sin embargo, la cantidad de muestras recolectadas, refleja el nivel de producción de ambos cultivos a nivel nacional (Valerín, S.F; Marín, 2016).

Las prácticas de manejo que realiza cada productor pueden influir en la presencia del hongo en los granos (Misihairabgwi *et al.*, 2019). Se debe tomar en cuenta que, el frijol, no es un cultivo que genera grandes ganancias para el productor nacional por lo que, para poder competir en precios, el productor debe reducir los costos de producción, incluyendo la mano de obra. A causa de la reducción en la mano de obra se ven comprometidas prácticas, como: nutrición del cultivo, recolección y eliminación de residuos de cultivo, monitoreo de plagas y corrección eficiente de estas. Lo que genera que el nivel de inóculo aumente y el producto se vea más expuesto a la contaminación por hongos del género *Aspergillus* (Valerín, 2021).

El estrés en la planta es otro factor que podría estar relacionado con la alta cantidad de *Aspergillus* spp. encontrados en los granos de frijol, principalmente en el caso de los que son provenientes de la Región Brunca. En esta Región, desde el 2016, se reportan aumentos en la temperatura, lo cual puede provocar déficit hídrico en las plantas lo que conlleva a una reducción en la biomasa foliar, baja calidad de semilla y vainas anormales; este estrés facilita el ingreso de hongos en la planta y el desarrollo de estos (Valerín, S.F; Barrios *et al.*, 2011).

En frijol, un 46% de las muestras de granos presentaron contaminación de hongos del género *Aspergillus*, la mayoría, provenientes de la Región Brunca (36% del total de muestras). Esto se debe, principalmente, a que la mayoría de las muestras fueron recolectadas en esa región. Además, en la Región Brunca se siembran varios ciclos productivos de frijol y hay una falta de prácticas de manejo adecuadas que disminuyan el inóculo del suelo. Esta falta de manejo puede generar que el inóculo sea diseminado por las diferentes fincas a través del suelo, material vegetal y el aire (Ritter *et al.*, 2011). El material de siembra es uno de los vectores que pueden facilitar la diseminación de estos hongos en las zonas productivas, ya que los granos de la misma cosecha se utilizan para siembra o para intercambio con otros productores (Valerín, 2021).

En frijol la Región Brunca fue la que presentó la mayor cantidad de muestras contaminadas, cabe resaltar que la mayoría de muestras son provenientes de esta región. Los factores climáticos favorecen la producción y desarrollo de hongos, este es tropical húmedo, por lo que presenta alta humedad relativa (entre 80% y 90% promedio anual) y temperaturas altas que rondan en promedio los 23.7°C (Comité Sectorial Regional Agropecuario, 2017). Los hongos del género *Aspergillus* pueden crecer en temperaturas desde los 12°C hasta los 48°C, sin embargo, su rango óptimo de crecimiento es de los 28°C a los 37°C, con humedad relativa mayor o igual a 80% (Thathana *et al.*, 2017). Las condiciones ambientales promedio anuales de la Región Brunca son concordantes con los requerimientos de crecimiento de los hongos del género *Aspergillus*, esto genera que se dé un aumento en la proliferación y desarrollo de este.

La recolección de muestras se realizó en los meses de julio y agosto, en el cantón de Pérez Zeledón entre los meses de abril y noviembre se da un aumento en las precipitaciones (Weather Spark, S.F). Este es uno de los factores de mayor impacto el incremento del desarrollo del inóculo en el suelo, así como en la diseminación de este entre los cultivos. Esto se debe al aumento de la humedad relativa, adicionalmente, durante los meses de incremento de precipitaciones se da una mayor periodo de exposición a la mojadura foliar así como de humedad ambiental (Thathana *et al.*, 2017; Arauz, 2011).

Entre los tipos de frijol, existen varios factores que pueden influir en que un tipo de grano sea mayormente afectado que otro. Primeramente, se debe tomar en cuenta el manejo del cultivo, principalmente los tratamientos poscosecha (Greeff *et al.*, 2020). Segundo, puede que los mecanismos de defensa de la planta varíen según el tipo de frijol, por ejemplo, la presencia de compuestos fenólicos con efecto antifúngico. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas que se pueden encontrar en células vegetales, o generarse en respuesta a factores bióticos o abióticos (Gutiérrez *et al.*, 2016). Estos compuestos, presentan efectos positivos en la disminución de los procesos oxidativos de los tejidos vegetales ocasionados por agentes fúngicos. En el caso de los granos de frijol, una mayor pigmentación está relacionada con un mayor contenido de compuestos fenólicos, de esta manera, el frijol rojo es el que presenta mayor contenido de compuestos fenólicos, seguido por el frijol negro y por último el blanco (Campello *et al.*, 2017). Campello *et al.* (2017) determinó un efecto positivo en el control de *Aspergillus oryzae* en 10 variedades de frijol, a causa de compuestos fenólicos que estos presentaban, los cuales varían en cantidad según el tipo de frijol, tal es el caso del frijol rojo el cual presenta un mayor contenido en comparación con el negro. Según los autores, el efecto se asocia principalmente con la inhibición de enzimas amilasas en los microorganismos. Lo anteriormente indicado, concuerda con los resultados observados en el presente estudio, en donde los granos de frijol rojo presentaron una menor contaminación por *Aspergillus* spp.

Por otro lado, en maní, un alto porcentaje de muestras (68%) no presentó contaminación por *Aspergillus* spp., a pesar de que la literatura indica que el maní es un cultivo altamente susceptible a la contaminación por este hongo (Granados *et al.*, 2017). Esto podría deberse a las regiones en las cuáles se recolectaron las muestras de maní. Nduti *et al.* (2017) determinaron variaciones en el desarrollo de los hongos del género *Aspergillus* entre regiones en Kenia, debido principalmente a diferencias en la humedad del suelo, tipo de suelo, prácticas de manejo, entre otros. En el caso específico de Costa Rica, la producción de maní es baja, ya que en su mayoría es importado, lo que impide que suceda contaminación cruzada de *Aspergillus* entre cultivos de maní.

Otro factor que pudo influir en la baja contaminación del maní por *Aspergillus* es que, en su mayoría, las muestras fueron recolectadas durante el periodo de cosecha por lo que no estuvieron almacenadas por largos periodos y eso pudo influir en la no proliferación del hongo. Adicionalmente, las muestras recolectadas se encontraban dentro de la vaina por lo que el grano estaba protegido de hongos y plagas. La contaminación de las plantas por hongos puede suceder por medio de las conexiones vasculares con la planta madre, contacto del grano con partes de la planta senescentes o que estuvieron en contacto con el suelo, también se puede dar una contaminación directa del grano si el hongo crece lo suficiente para atravesar la cubierta seminal (Pérez *et al.*, 2007). Por otro lado, para que exista una contaminación con *Aspergillus* spp., el hongo debe extenderse por la cáscara y la cubierta del grano de maní (Jayaprakash *et al.*, 2019), lo cual no sucedió en este caso ya que las muestras fueron abiertas dentro de una cámara de flujo laminar, evitando el contacto del exterior de la cáscara con él grano.

## **7.2 Especies de *Aspergillus* identificadas y su toxicidad**

En frijol la especie que se presentó con mayor frecuencia en los aislamientos fue *Aspergillus flavus*. Esta es una especie altamente toxigénica y común entre los cultivos, es un hongo con un ciclo de vida mayoritariamente saprófito, es decir, que puede sobrevivir a partir de materia orgánica. Adicionalmente produce esclerocios, estos son estructuras de resistencia que facilitan la supervivencia del hongo aún en

condiciones de estrés. Por otra parte, al presentar conidios como estructuras de reproducción se ve facilitado la diseminación por viento, insectos u otro medio.

La presencia de *A. flavus* en los productos agrícolas no implica que los hongos estén produciendo aflatoxinas, sin embargo, la alta cantidad de aislamientos recuperados en el presente estudio suponen un potencial peligro para los consumidores. Cabe resaltar que todas las especies identificadas del género *Aspergillus* en este estudio son micotoxigénicas como se muestra en el Anexo 8. En ambos tipos de grano, *A. niger* fue una especie que se identificó en un alto porcentaje, es importante hacer notar lo altamente toxigénica que esta puede llegar a ser, ya que puede producir hasta 27 tipos distintos de micotoxinas.

*Aspergillus niger* es un hongo de tonalidades negras pertenecientes a la sección Nigri. Se encuentra altamente distribuido por el mundo ocasionando deterioro en los productos agrícolas además de pérdidas económicas por contaminación de micotoxinas. Este hongo, se encuentra generalmente en el suelo lo que facilita la contaminación de los cultivos (Perrone *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2019). Sin embargo, algunas cepas son utilizadas para fermentación, por lo que *A. niger* también es considerado como seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos para ser utilizado en procesos de la industria alimenticia.

### **7.3 Cepas no toxigénicas de *Aspergillus flavus***

El uso de cepas no toxigénicas es uno de los métodos de control que han demostrado mayor eficiencia para la disminución de las cepas toxigénicas en campo. Una de las formas en las que se pueden producir a partir de la recombinación genética de cepas con polimorfismos distintos, es decir que no presentan compatibilidad vegetativa, lo que conlleva a que no suceda transferencia de genes relacionados con la ruta de biosíntesis de aflatoxinas (Kagot *et al.*, 2019; Tafesse *et al.*, 2021).

Por lo que la distribución de estas cepas entre las cinco zonas analizadas no se ve influenciado por factores ambientales, si no, principalmente genéticos, así como por el tipo de morfología de las cepas. Ya que, el tamaño de los esclerocios que estos producen influye en gran medida, a menor tamaño de esclerocio menor en el contenido de toxina que pueden producir. Las cepas que producen esclerocios se dividen en polimorfismo S y L, siendo los esclerocios de los S más grande que los L. A su vez los S producen más micotoxinas que los L, estos últimos producen menor cantidad, adicionalmente, la mayoría de las cepas no toxigénicas son provenientes de los polimorfismos L (Kagot *et al.*, 2019).

Las especies de *A. flavus* varían entre las regiones de las cuales son procedentes, así como su adaptabilidad a dichos climas; este hecho cobra gran relevancia para el uso de cepas no toxigénicas provenientes de determinada región como controladores biológicos. A pesar de que ya se han desarrollado productos y se ha demostrado su eficiencia, estas cepas no se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de Costa Rica, adicionalmente se debe evitar la introducción de cepas que no sean procedentes del país con el fin de no alterar los ecosistemas. Por lo que, la identificación de estas 25 cepas no toxigénicas de *A. flavus* en frijol, fue el primer paso para el desarrollo de un producto de control biológico en Costa Rica.

El porcentaje de muestras contaminadas por *A. flavus* puede indicar que los granos de frijol producidos a nivel nacional están contaminados por aflatoxinas y, por tanto, ser una amenaza para la salud humana. Esto justifica la necesidad de implementar medidas de control en los granos producidos a nivel nacional, ya que no se les realiza pruebas de contenidos de micotoxinas, a pesar de estar regulado por los decretos 27980 y 27964 (Decreto no. 27980-S, 1999; Decreto no. 27964, 1999).

## **8. Conclusiones**

- En Costa Rica se encuentran presentes distintas especies del género *Aspergillus* en granos de frijol y maní producidos a nivel nacional.
- Todas las especies identificadas son potencialmente micotoxigénicas, lo cual representa un peligro potencial para los consumidores de estos productos. Principalmente, en el caso de frijol donde la principal especie fue *Aspergillus flavus*.
- En Costa Rica existen aislamientos no toxigenicos de *Aspergillus flavus*. Este resultado permitió establecer un primer aporte para el desarrollo de productos de control biológico a partir de cepas no toxigénicas en frijol y maní.

## **9. Sugerencias**

- Aumentar el número de muestras tanto en maní, como en frijol blanco y mantequilla, de forma que se homogenice el número de muestras.
- Optimizar la amplificación con los marcadores asociados a genes de la biosíntesis de aflatoxinas como *hypB* y *nor1*, de forma que también puedan ser utilizados para el proceso de preselección de las muestras no toxigénicas.

## 10. Anexos

Anexo 1. Componentes para las reacciones de PCR en tiempo final utilizadas.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>
Agua	variable
Buffer Taq ADN Polymerasa	1 X
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
dNTP's	200 µM
Primer F	0.2 µM
Primer R	0.2 µM
Taq ADN Polymerasa	0,05 U/µl
ADN	100 ng/µl
Volumen final de la reacción: 15 µl	

Anexo 2. Perfil térmico del PCR en tiempo final, para la amplificación de región ITS en *Aspergillus*.

<b>Fases</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	30 segundos	30
Anillamiento	60	30 segundos	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	5 minutos	1

Anexo 3. Perfil térmico de PCR en tiempo final para la amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas en *Aspergillus flavus*.

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	30 segundos	30
Anillamiento	55	30 segundos	
Extensión	72	90 segundos	
Extensión final	72	7 minutos	1

Anexo 4. Muestras recolectadas de frijol

Número de muestra	Fecha de muestreo	Frijol	Localidad	Cosecha	Variedad	Observaciones
1	29/8/2019	Negro	Pueblo nuevo	Desconocida	Nambi	Águila de Pejibaye
2	29/8/2019	Negro	San Vicente	13/8/2019	Nambi	Águila de Pejibaye
3	29/8/2019	Negro	Las Delicias	Desconocida	Nambi	Águila de Pejibaye
4	29/8/2019	Negro	El águila	28/8/2019	Nambi	Águila de Pejibaye, secando al sol
5	29/8/2019	Negro	San Vicente	29/8/2019	Nambi	Águila de Pejibaye, reserva indígena
6	29/8/2019	Negro	Veracruz	Desconocida	Nambi	Águila de Pejibaye, producto orgánico
7	29/8/2019	Negro	Pejibaye	Desconocida	Desconocida	Centro de Pejibaye
8	29/8/2019	Negro	Pejibaye	29/8/2019	Desconocida	Centro de Pejibaye
9	29/8/2019	Negro	Zapote	28/8/2019	Desconocida	Coopeceproma
10	30/8/2019	Negro	El Águila, Pejibaye	15/8/2019	Desconocida	Mercado de Pérez
11	29/8/2019	Negro	San Vicente	Desconocida	Desconocida	Águila de Pejibaye
12	29/8/2019	Negro	Zapote	Desconocida	Nambi	Águila de Pejibaye
13	30/8/2019	Negro	El Águila	Desconocida	Guaymí	Mercado de Pérez
14	29/8/2019	Negro	Las Delicias	8/29/2019	Desconocida	Frijoles Veracruz

15	30/8/2019	Negro	San Juan de las vegas	Enero/febrero 2019	Chingo	Parrita
16	29/8/2019	Negro	Desconocido	29/7/2019	Desconocida	Coopeceproma
17	29/8/2019	Negro	Pejibaye	Desconocida	Desconocida	Centro de acopio Pejibaye
18	29/8/2019	Negro	El progreso	Desconocida	Desconocida	Coopeceproma
19	29/8/2019	Negro	El progreso	8/27/2019	Desconocida	Coopeceproma
20	29/8/2019	Negro	Colinas	8/28/2019	Desconocida	Asoprocova
21	29/8/2019	Negro	Fila Santa Teresita	8/18/2019	Nambi	Asoprocova
22	29/8/2019	Negro	Las Delicias	8/29/2019	Desconocida	Frijoles Veracruz
23	30/8/2019	Negro	Parrita	10/7/1905	Desconocida	Parrita
24	29/8/2019	Negro	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Frijoles Veracruz
25	29/8/2019	Negro	Veracruz	8/29/2019	Desconocida	Frijoles Veracruz
26	29/8/2019	Negro	Veracruz	Desconocida	Desconocida	Feria del agricultor
27	30/8/2019	Negro	San Juan de las vegas	Enero/febrero 2019	Cañita	Parrita
28	29/8/2019	Negro	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Coopeceproma
29	29/8/2019	Negro	El águila	29/8/2019	Desconocida	Frijoles Veracruz
30	29/8/2019	Negro	Cedral de colinas	18/8/2019	Desconocida	Asoprocova
31	10/9/2019	Negro	Las Vueltas	Desconocida	Desconocida	La guácima
32	10/9/2019	Negro	La Garita	Desconocida	Matambú	Semilla
33	10/9/2019	Negro	La Garita	Desconocida	UCR55	Semilla
34	10/9/2019	Negro	La Garita	Desconocida	Nambi	Semilla
35	10/9/2019	Negro	La Garita	Desconocida	Brunca	Semilla
36	10/9/2019	Negro	La Garita	Desconocida	Guaymí	Semilla
37	10/9/2019	Rojo	La Garita	Desconocida	Taymi	16/1/1900
38	10/9/2019	Rojo	La Garita	Desconocida	Cabecar	Semilla
39	10/9/2019	Rojo	La Garita	Desconocida	Saca pobres	Semilla
40	10/9/2019	Rojo	La Garita	Desconocida	Generalito	Semilla
41	17/9/2019	Rojo	Los Ángeles	Desconocida	Desconocida	Santa Cecilia
42	29/8/2019	Rojo	Desconocido	29/7/2019	Desconocida	Coopeceproma
43	30/8/2019	Rojo	Rivas	Desconocida	Desconocida	Mercado de Pérez
44	30/8/2019	Rojo	San Juan de las vegas	Desconocida	Chingo	Parrita
45	29/8/2019	Rojo	Parrita	10/7/1905	Desconocida	Parrita
46	29/8/2019	Rojo	Buenos Aires	10/7/1905	Desconocida	Maíz de Colina
47	29/8/2019	Rojo	Colinas	28/8/2019	Cabecar	Asoprocova
48	17/9/2019	Rojo	Juan Díaz de Nicoya	Desconocida	Cabecar	Nicoya
49	29/8/2019	Rojo	Zapote	27/8/2019	Desconocida	Coopeceproma
50	29/8/2019	Rojo	Zapote	29/8/2019	Desconocida	Coopeceproma

51	29/8/2019	Rojo	Veracruz	Desconocida	Desconocida	Frijoles Veracruz
52	30/1/2019	Rojo	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Mercado de Pérez
53	10/9/2019	Rojo	Las Vueltas	Desconocida	Desconocida	La guácima
54	29/8/2019	Rojo	San Martín	15/8/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye
55	29/8/2019	Rojo	San Martín	18/7/2019	Victoria	Águila de Pejibaye
56	29/8/2019	Rojo	San Martín	7/8/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye
57	29/8/2019	Rojo	San Vicente	16/8/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye
58	29/8/2019	Rojo	San Martín	19/8/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye
59	29/8/2019	Rojo	El águila	31/7/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye
60	29/8/2019	Rojo	Zapote	29/8/2019	Desconocida	Coopeceproma
61	29/8/2019	Rojo	San Martín	Desconocida	Talamanca	Águila de Pejibaye
62	29/8/2019	Rojo	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Frijoles Veracruz
63	29/8/2019	Rojo	San Martín	Desconocida	Talamanca	Águila de Pejibaye
64	29/8/2019	Rojo	Guagaral	26/8/2019	Desconocida	Coopeceproma
65	30/1/2019	Rojo	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Mercado de Pérez, Tierno
66	29/8/2019	Rojo	Zapote	27/8/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye, secando al sol
67	29/8/2019	Rojo	Pejibaye	Desconocida	Desconocida	Centro de acopio Pejibaye
68	29/8/2019	Rojo	Veracruz	Desconocida	Victoria	Águila de Pejibaye, producto orgánico
69	29/8/2019	Rojo	Veracruz	Desconocida	Aguacatillo	Águila de Pejibaye
70	29/8/2019	Rojo	San Pedro de Cajon	14/8/2019	Victoria	Águila de Pejibaye
71	29/8/2019	Rojo	San Luis de Colinas	26/8/2019	Cabecar	Asoprocova
72	29/8/2019	Rojo	Pejibaye	Desconocida	Desconocida	Centro de acopio Pejibaye
73	29/8/2019	Rojo	Pejibaye	Desconocida	Desconocida	Centro de acopio Pejibaye
74	30/8/2019	Rojo	San Juan de las vegas	Desconocida	Sierra	Parrita
75	29/8/2019	Rojo	San Martín	Desconocida	Bribri	Águila de Pejibaye
76	29/8/2019	Rojo	San Martín	20/8/2019	Cabecar	Águila de Pejibaye
77	10/9/2019	Rojo	Escobal	Desconocida	Desconocida	Casa de productor

78	29/8/2019	Rojo	El águila	Desconocida	Generalito	Águila de Pejibaye
79	30/8/2019	Mantequilla	San Juan de las vegas	Enero/febrero 2019	Mantequilla	Parrita
80	29/8/2019	Mantequilla	El águila	Desconocida	Mantequilla	Águila de Pejibaye
81	30/8/2019	Blanco	Parrita	Desconocida	Desconocida	Parrita
82	30/8/2019	Rojo	Parrita	Desconocida	Desconocida	Parrita
83	3/11/2019	Rojo	San Juan Cañas	1/10/2019	Desconocida	Guanacaste

Anexo 5. Muestras recolectadas de maní

Número de muestra	Fecha de muestreo	Localidad	Cosecha	Variedad
1	10/1/2020	San Rafael	Desconocido	Desconocido
2	10/1/2020	San Rafael	Desconocida	Desconocido
3	10/9/2019	Las Vueltas	Desconocida	Desconocida
4	3/12/2020	Los Lagos la Garita	2/12/2019	Maní criollo
5	4/11/2019	Triunfo de medio Queso Los chiles	25/11/2019	Americano seco
6	4/11/2019	El triunfo de medio Queso Los chiles	4/11/2019	Americano
7	10/9/2019	Escobal	Desconocido	Criollo
8	16/9/2019	San Martin Nicoya	Desconocido	Desconocida
9	3/11/2019	Escobal Atenas	Noviembre	Criollo
10	3/12/2019	Escobal de Atenas	3/12/2019	Desconocido
11	4/11/2019	triunfo de medio queso los Chiles	15/11/2019	Desconocido
12	10/9/2019	Escobal	Desconocida	Criolla
13	3/11/2019	Escobal de Atenas	may-19	Desconocida
14	4/12/2019	El triunfo de medio Queso Los chiles	ene-18	Americano
15	4/11/2019	El triunfo de medio Queso Los chiles	30/11/2019	Americano

16	3/11/2019	Escobal Atenas	nov-19	Criollo Rastrojo
17	3/11/2019	San Juan Cañas	Agosto	Valencia
18	4/12/2019	El triunfo de medio Queso Los chiles	1/12/2019	Americano
19	10/9/2019	Guácima	Desconocido	americano

Anexo 6. Identificación a nivel de especie de los aislamientos de *Aspergillus* spp. en frijol

Muestra	Especie	Query cover (%)	Per ident (%)	Muestra	Especie	Query cover (%)	Per ident (%)
2A2	<i>A. flavus</i>	98	100	38A3	<i>A. tubingensis</i>	99	94.95
2A3	<i>A. flavus</i>	100	100	40B1	<i>A. flavus</i>	100	99.73
2A4	<i>A. flavus</i>	99	100	40B3	<i>A. flavus</i>	85	90.87
2B1	<i>A. flavus</i>	99	99.19	43A1	<i>A. aculeatinus</i>	97	99.63
2C2	<i>A. flavus</i>	99	99.73	43A2	<i>A. aculeatinus</i>	97	99.63
5A1	<i>A. flavus</i>	100	100	43A3	<i>A. aculeatinus</i>	99	96.22
5A2	<i>A. flavus</i>	99	98.78	48A1	<i>A. niger</i>	98	98.94
5B2	<i>A. flavus</i>	95	98.9	48A2	<i>A. niger</i>	98	99.29
5B3	<i>A. flavus</i>	100	100	48A3	<i>A. niger</i>	99	98.96
5D1	<i>A. flavus</i>	96	98.9	48B1	<i>A. flavus</i>	98	100
5D2	<i>A. flavus</i>	89	96.88	48B2	<i>A. flavus</i>	98	94.85
5D3	<i>A. flavus</i>	98	99.18	48C1	<i>A. niger</i>	97	99.29
5E2	<i>A. flavus</i>	98	98.92	48C2	<i>A. niger</i>	98	99.3
5E3	<i>A. flavus</i>	93	93.23	48D1	<i>A. niger</i>	97	89.54
5G1	<i>A. flavus</i>	97	100	48D2	<i>A. niger</i>	97	99.29
5F1	<i>A. aculeatinus</i>	99	99.46	48D3	<i>A. niger</i>	98	98.6
5F3	<i>A. niger</i>	100	99.19	48F1	<i>A. flavus</i>	95	97.26
6A2	<i>A. flavus</i>	97	99.72	48F2	<i>A. flavus</i>	99	99.67
7A2	<i>A. flavus</i>	90	93.93	48I1	<i>A. flavus</i>	96	97.64
8A2	<i>A. flavus</i>	96	96.33	48I2	<i>A. oryzae</i>	82	91.03
9A1	<i>A. flavus</i>	96	98.52	48I3	<i>A. flavus</i>	96	91.02
9A2	<i>A. flavus</i>	92	95.47	48J1	<i>A. flavus</i>	75	95.35
9B1	<i>A. flavus</i>	91	98.64	49A3	<i>A. tamarii</i>	78	95.56
10A1	<i>A. flavus</i>	100	99.63	49B1	<i>A. flavus</i>	99	99.72
10A2	<i>A. flavus</i>	99	99.73	49B2	<i>A. flavus</i>	97	100
11A1	<i>A. niger</i>	100	100	49B3	<i>A. flavus</i>	97	100
11A2	<i>A. niger</i>	98	99.12	49B4	<i>A. flavus</i>	99	99.73
11A4	<i>A. niger</i>	98	98.95	50A1	<i>A. niger</i>	98	99.12

11A5	<i>A. niger</i>	95	100	50A2	<i>A. niger</i>	99	98.43
11B3	<i>A. flavus</i>	46	88.99	50A3	<i>A. niger</i>	97	93.1
13A1	<i>A. flavus</i>	35	96.39	54A1	<i>A. flavus</i>	99	98.42
16A2	<i>A. flavus</i>	50	90.6	54A2	<i>A. flavus</i>	99	98.93
16A3	<i>A. flavus</i>	96	98.55	54B2	<i>A. flavus</i>	99	98.77
16B2	<i>A. flavus</i>	80	97.22	54C1	<i>A. flavus</i>	96	99.45
16B1	<i>A. flavus</i>	96	99.82	54C2	<i>A. flavus</i>	96	99.09
16B3	<i>A. flavus</i>	96	99.28	57A1	<i>A. flavus</i>	99	98.59
16E1	<i>A. flavus</i>	99	97.37	57A2	<i>A. flavus</i>	99	98.23
16E2	<i>A. flavus</i>	78	96.69	57D1	<i>A. flavus</i>	98	91.67
17B2	<i>A. niger</i>	98	99.29	57D2	<i>A. flavus</i>	98	94.89
17C1	<i>A. oryzae</i>	98	96.55	57C2	<i>A. flavus</i>	89	98.06
17C2	<i>A. flavus</i>	100	98.44	57E1	<i>A. niger</i>	97	98.94
17C3	<i>A. flavus</i>	74	97.11	57E2	<i>A. niger</i>	99	99.13
17D1	<i>A. aculeatinus</i>	98	99.45	57E3	<i>A. niger</i>	99	98.25
17D2	<i>A. aculeatinus</i>	99	97.29	58A1	<i>A. flavus</i>	99	98.6
17D3	<i>A. aculeatinus</i>	67	97.26	58B2	<i>A. flavus</i>	99	98.24
19A1	<i>A. tubingensis</i>	96	97.53	58C1	<i>A. flavus</i>	95	99.08
19A2	<i>A. niger</i>	98	99.29	58C2	<i>A. flavus</i>	97	99.45
19A3	<i>A. niger</i>	97	91.07	58D1	<i>A. oryzae</i>	96	99.27
19A4	<i>A. niger</i>	92	84.01	58D2	<i>A. flavus</i>	99	97.5
20A1	<i>A. niger</i>	98	99.12	63A2	<i>A. niger</i>	97	99.29
20A2	<i>A. niger</i>	96	99.82	64A1	<i>A. niger</i>	98	98.77
20A3	<i>A. niger</i>	99	98.96	64A2	<i>A. niger</i>	96	98.94
21A1	<i>A. niger</i>	95	99.28	64A3	<i>A. niger</i>	97	99.64
21B1	<i>A. niger</i>	97	97.13	66A1	<i>A. flavus</i>	99	96.47
21B2	<i>A. flavus</i>	94	94.56	66A2	<i>A. flavus</i>	99	99.73
21B3	<i>A. flavus</i>	86	91.07	66C2	<i>A. flavus</i>	61	93.65
21C1	<i>A. fischeri</i>	96	99.45	70A2	<i>A. niger</i>	98	98.78
21C2	<i>A. fischeri</i>	94	99.81	70A3	<i>A. niger</i>	98	99.29
21C3	<i>A. fischeri</i>	98	98.24	70B1	<i>A. flavus</i>	89	92.67
21E1	<i>A. flavus</i>	100	99.38	70B2	<i>A. flavus</i>	94	90.43
21E2	<i>A. flavus</i>	97	93.72	70C1	<i>A. niger</i>	98	99.12
21E3	<i>A. flavus</i>	94	97.52	70C2	<i>A. niger</i>	96	95.72
25A1	<i>A. niger</i>	98	99.12	71A1	<i>A. flavus</i>	96	97.56
25A2	<i>A. niger</i>	98	99.3	71A2	<i>A. flavus</i>	98	99.11
29B2	<i>A. niger</i>	99	99.29	75A1	<i>A. niger</i>	97	99.29
29B3	<i>A. niger</i>	97	99.29	75A2	<i>A. niger</i>	99	98.78
29C1	<i>A. niger</i>	99	99.47	75A3	<i>A. niger</i>	98	98.6
29C2	<i>A. niger</i>	96	97.76	75B1	<i>A. oryzae</i>	84	92.12
29E1	<i>A. niger</i>	99	99.13	75B2	<i>A. flavus</i>	81	95.89

29E2	<i>A. niger</i>	98	98.95	75B3	<i>A. flavus</i>	97	89.23
29E3	<i>A. niger</i>	99	98.95	75C2	<i>A. flavus</i>	97	99.28
30A1	<i>A. flavus</i>	100	100	79B1	<i>A. niger</i>	99	98.44
30A2	<i>A. flavus</i>	100	100	79B2	<i>A. niger</i>	98	99.13
33A1	<i>A. brasiliensis</i>	95	96.29	79B3	<i>A. niger</i>	98	98.77
33A2	<i>A. brasiliensis</i>	96	96.41	80A1	<i>A. flavus</i>	99	96.65
34A1	<i>A. flavus</i>	79	96.86	80A2	<i>A. flavus</i>	97	99.1
34A2	<i>A. flavus</i>	95	97.37	81A3	<i>A. niger</i>	93	96.25
38A1	<i>A. niger</i>	99	98.95	81B1	<i>A. flavus</i>	96	97.06
38A2	<i>A. niger</i>	94	95.04	82A1	<i>A. japonicus</i>	98	98
				82A2	<i>A. japonicus</i>	99	98.19

Anexo 7. Identificación a nivel de especie de los aislamientos de *Aspergillus* spp. en maní

Muestra	Especie	Query cover (%)	Per ident (%)
1A1	<i>A. niger</i>	99	98.93
2A2	<i>A. niger</i>	86	98.03
3B1	<i>A. niger</i>	86	96.69
3B2	<i>A. niger</i>	97	99.47
3B3	<i>A. niger</i>	97	98.24
3E1	<i>A. melleus</i>	96	98.55
3E2	<i>A. melleus</i>	97	99.46
3E3	<i>A. melleus</i>	96	99.45
3F1	<i>A. niger</i>	97	99.29
3F2	<i>A. niger</i>	98	98.77
3F3	<i>A. niger</i>	96	94.04
5B3	<i>A. flavus</i>	97	97.89
8A1	<i>A. niger</i>	90	97.39
8A2	<i>A. niger</i>	97	97.38
8C1	<i>A. niger</i>	97	98.94
8C2	<i>A. niger</i>	97	99.29
8C3	<i>A. niger</i>	98	98.6
8G1	<i>A. niger</i>	96	85.44
8G2	<i>A. niger</i>	99	94.1
8G3	<i>A. niger</i>	97	98.24
8G4	<i>A. niger</i>	99	95.39
8H1	<i>A. terreus</i>	98	99.14
14C1	<i>A. tamarii</i>	67	91.69
14C2	<i>A. tamarii</i>	85	95.81

Anexo 8. Especies del género *Aspergillus* identificadas en las muestras de granos de maní y frijol y las posibles micotoxinas que estas producen. El signo (+) significa que producen la micotoxina, mientras que el signo (–) significa que no la producen. Fuente: (Lamboni *et al.*, 2016; Abarca *et al.*, 2000; Bau, 2005)

Micotoxina	<i>A. aculeatinus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fischeri</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>A. melleus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. tubingensis</i>
14-Epiaszonapirona A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ácido ciclopiazónico	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ácido kójico	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ácido tensyúico A / F	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Ácido tensyúico B/ C/ D	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Aflatoxina B1/ B2/ G1/ G2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Antafumicina A/ B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asperazina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Aszonalenina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Atromentin	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Aurasperona C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Aurasperona F/ E/ B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Deoxinivalenol (DON)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Flavasperona	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Fonsecin B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Fumitremorgin	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Fumonisina B2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Fumonisina B4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Funalenona	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Kotanin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Malformina A2/ C	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Nafuredin	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Nigerapyrone E	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Nigerasperona A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Nigerazina A/ B	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nigragilina	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Nominine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Ocratoxina A	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Ocratoxina B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Orlandin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Piranonigrina A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+

Piranonigrina B / C/ D	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Pirofeno	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Rubrofusarina	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Sartorypyrone A/ E	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Tensidol A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Tensidol B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Tubingensin A/ B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

## 11. Bibliografía

- Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista iberoamericana Micología*. 17: 79-84.
- Accinelli, C; Abbas, H; Bruno, V; Nissen, L; Vicari, A; Bellaloui, N; Little, N; Thomas, W. 2020. Persistence in soil of microplastic films from ultra-thin compostable plastic bags and implications on soil *Aspergillus flavus* population. *Waste Management*. 113: 312–318.
- Adeyeye, S. 2016. Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1): 1-11.
- Alves, B; Diepeningen, A; Cruz, J; Eleutéria, I; Waalwijk, C. 2019. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. *International Journal of Food Microbiology*. 292: 91-100.
- Arauz, L. 2011. *Fitopatología un enfoque agroecológico*. San José, Costa Rica. 519 p.
- Astoreca, A; Dalcerro, A; Pinto, F; Vaamonde, G. 2011. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section Flavi in poultry feeds. *International Journal of Food Microbiology*. 146: 38-43.
- Bandyopadhyay, R; Ortega, A; Akande, A; Mutegi, C; Atehnkeng, J; Kaptoge, L; Senghor, A; Adhikari, B; Cotty, P. 2016. Biological control of aflatoxins in Africa: current status and potential challenges in the fase of climate change. *World Mycotoxin Journal*. 9 (5): 771-789.
- Barrios, E; Lopez, C; Kohashi, J. 2011. Relaciones hídricas y temperaturas altas en frijol del tipo “Flor de Mayo”. *Agronomía Costarricense*. 35(1): 131-145.
- Bau, M. 2005. *Caracterización molecular de especies ocratoxigénicas del género Aspergillus sección Nigri*. Tesis Doc. España. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. 381 p.

- Beebe, S; Ramirez, J; Álvarez, P; Ricaurte, J; Mora, A; Guerrero, A; Rosas, J; Rodríguez, J; Van den Berg, M. 2017. Modelación del frijol en Latinoamérica: Estado del arte y base de datos para parametrización. European Union. 52 p.
- Bhatnagar, P; Sunkara, S; Bhatnagar, M; Waliyar, F; Kumar, K. 2015. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. Plant Science. 1-46.
- Bogantes, P; Bogantes, D; Bogantes S. 2004. Aflatoxinas. Acta Medica Costarricense. 46 (4): 174-178.
- Brandfass, C; Karlovsky, P. 2008. Upscaled CTAB-Based DNA Extraction and Real-Time PCR Assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in Plant Material with Reduced Sampling Error. International Molecular Sciences. 9: 2306-2321.
- Caceres, I; Khoury, A; Khoury, R; Lorber, S; Oswald, I; Khoury, A; Atoui, A; Puel, O; Bailly, J. 2020. Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. Toxins. 12(3): 1-28.
- Campello, A; Kupski, L; Badiale, E. 2017. Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. Food Chemistry. 214:293-299
- Chawanthayatham, S; Valentine, C; Fedeles, B; Fox, E; Loeb, L; Levine, S; Slocum, S; Wogan, G; Croy, R; Essigmann, J. 2017. Mutational spectra of aflatoxin B1 in vivo establish biomarkers of exposure for human hepatocellular carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 33(1): 65-73.
- Cleveland, T; Yu, J; Fedorova, N; Bhatnagar, D; Payne, G; Nierman, W; Bennett, J. 2009. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. Trends in Biotechnology. 27 (3): 151-157.
- Comité Sectorial Regional Agropecuario. 2017. Plan regional de acciones climáticas y gestión de riesgo 2018-2022 (en línea). Consultado 9 nov. 2020. Disponible en [http://www.infoagro.go.cr/InfoRegiones/Documents/PRDAR\\_2015-2018\\_Brunca.pdf](http://www.infoagro.go.cr/InfoRegiones/Documents/PRDAR_2015-2018_Brunca.pdf)

- Cotty, P; Antilla, L; Wakelyn, P. 2007. 27 Competitive exclusion of Aflatoxin Producers: Farmer-driven research and development. *Biological Control: a Global Perspective*. 241- 2553 pp.
- Daou, R; Joubrane, K; Maroun, R; Rabbaa, L; Ismail, A; El Khoury, A. 2021. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *Agriculture and food*. 6 (1): 416-447.
- Decreto no. 27964, 1999. Regulación del contenido máximos de aflatoxinas en maní. *Diario Oficial La Gaceta*. Costa Rica. 19 oct.
- Decreto no. 27980-S, 1999. Nivel máximo de aflatoxinas en maíz, frijol, trigo, oleaginosas y leguminosas. *Diario Oficial La Gaceta*. Costa Rica. 20 jul.
- Esteo, S. 2018. Determinación de residuos de micotoxinas en alimentos mediante Cromatografía de Líquidos/Espectrometría de Masas. Tesis Lic. España: Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales. 49 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). S.F. Micotoxinas (en línea, sitio web). Consultado 21 mar. 2020. Disponible en <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>
- Frisvad, J; Hubka, V; Ezekiel, C; Hong, S; Novakova, A; Chen, A; Arzanlou, M; Larsen, T; Sklenar, F; Mahakarnchanaakul, W; Samson, R; Houbraeken, J. 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of alatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*. 93: 1-63.
- Gil, J; García, M; Vázquez, C; González, M; Patiño, B. 2019. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. *Food Microbiology*. 82: 240-248.
- Gimeno, A; Martins, M. 2011. Micotoxinas y Micotoxicosis en animales y humanos. Florida, Estados Unidos, *Special Nutrients*. 16 p.
- Granados, F; Molina, A; Chavarría, G; Alfaro, M; Bogantes, D; Murillo, A. 2017. Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: Applying the One Health approach to mycotoxins surveillance. *Food Control*. 82: 217-226.

- Greeff, M; Beukes, I; Marais, G; Jacobs, K. 2020. Mycotoxin production by three different toxigenic fungi genera on formulated abalone feed and the effect of an aquatic environment on fumonisins. *Mycology*. 11 (2): 105-117.
- Gutiérrez, Y; Cruz, M; Sánchez, C; Leiva, M; Acosta, A; Roque, B; Torres, R; Alvarado, Y. 2016. Total phenol content in seed coat of three cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Biotecnología Vegetal*. 16(2): 125-128.
- Hall, T. 1999. Bioedit: A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41(4):95-98
- Hernández, J. 2009. Manual de recomendaciones técnicas cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria-Instituto de Desarrollo Agrario, San José, Costa Rica. 79 p.
- Jallow, A; Xie, H; Tang, X; Qi, A, Li, P. 2021. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: from occurrence to control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2332-2381
- Jayaprakash, A; Thanmalagan, R; Roy, A; Arunachalam, A; Lakshmi, P. 2019. Strategies to Understand *Aspergillus flavus* Resistance Mechanism in *Arachis hypogaea* L. *Current Plant Biology*. 20: 1-36.
- Kagot, V; Okoth, S; De Boevre, M; De Saeger, S. 2019. Biocontrol of *Aspergillus* and *Fusarium* micotoxins in Africa: Benefits and limitations. *Toxins*. 11(2): 1-9.
- Kinyungu, S; Isakeit, T; Ojiambo, P; Woloshuk, C. 2019. Spread of *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation in postharvested maize treated with biocontrol products. *Journal of Stored Products Research*. 84 (101519): 1-7
- Klich, 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraal bureau voor schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands. 116 p.
- Kul, R; Ekinici, M; Yildirim, E. 2019. Production of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Turkey. 2st International Conference on food, agriculture and animal sciences. 8-11.

- Lamboni, Y; Nielsen, K; Linnemann, A; Gezgin, Y; Hell, K; Nout, M; Smid, E; Tamo, M; Boekel, M; Blaesbjerg, J; Frisvad, J. 2016. Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus* section Nigri Isolated from Raw Cashew Nuts from Benin, west Africa. PLOS One. 1-14.
- Lanzas, M. 2018. Detectan 26 000 kilos de maní con aflatoxinas. Diario Extra, San José, Costa Rica; 16 jun.:1.
- Luis, J; Carbone, I; Payne, G; Bhatnagar, D; Cary, J; Moore, G; Lebar, M; Wei, Q; Mack, B; Ojiambo, P. 2020. Characterization of morphological changes within stromata during sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. Mycologia: 1-13.
- Marín, A. 2016. Cada año en Costa Rica se cosechan 138 000 kilos de maní. Teletica, San José, Costa Rica; 21 sep.: 2016.
- Marín, S; Ramos, A; Cano, G; Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food and Chemical Toxicology. 60: 2018-237.
- Ministerio de Agroindustria. 2018. Cadena del Maní (en línea). Secretaria de alimentos y bioeconomía. Consultado 29 nov. 2019. Disponible [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cadenas%20de%20Valor%20de%20Alimentos%20y%20Bebidas/informes/Resumen\\_Cadena\\_2018\\_MANI.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cadenas%20de%20Valor%20de%20Alimentos%20y%20Bebidas/informes/Resumen_Cadena_2018_MANI.pdf)
- Misihairabgwi, J; Ezekiel, C; Sulyok, M; Shephard, G; Krska, R. 2019. Mycotoxin Contamination of Foods in Southern Africa Review (2007-2016). 59 (1): 43-58.
- Murphy, P; Hendrich, S; Landgren, C; Bryant, C. 2006. Food mycotoxins: an update. Scientific Status Summary. 71(5): 51-65.
- Mwakinyali, S; Ding, X; Ming, Z; Tong, W; Zhang, Q; Li, P. 2019. Recent development of aflatoxin contamination biocontrol in agricultural products. Biological Control. 128: 31-39.
- Nduti, N; Njeru, P; Mwaniki, M; Reid, G. 2017. Aflatoxin variations in maize flour and grains collected from various regions of Kenya. African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development. 17 (1): 11743-11756.

- Ostry, V; Malir, F; Toman, J; Grosse, Y. 2017. Mycotoxins as human carcinogens-The IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*. 33(1): 65-73.
- O'Neal, K. 2017. Detectan contaminación de granos con micotoxinas que causan cáncer. Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica; 30 may.: 1.
- Palacio, A. 2016. Caracterización de las poblaciones de *Aspergillus* sección flavi presentes en trigo y sorgo. Tesis M.Sc. Uruguay: Universidad Republica de Uruguay. Laboratorio de Micología. 62 p.
- Pérez, M; Cavallo, A; Maia, M. 2007. Nivel de infección fúngica natural en relación a la calidad de semillas de maní. *Revista Brasileira de Sementes*. 29 (2): 53-59.
- Perrone, G; Susca, A; Cozzi, G; Ehrlich, K; Varga, J; Frisvad, J; Meijer, M; Noonim, P; Mahakarnchanakul, W; Samson, R. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*. 59: 53-66.
- Pildain, M. 2006. Caracterización fenotípica y molecular de *Aspergillus* sección Flavi. Estudio de la genética poblacional y capacidad toxigénica de *Aspergillus flavus* en maní. Tesis Dr. Argentina: Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 221 p.
- Pichardo, D; Elizondo, J. 2020. Impacto de las aflatoxinas B1/M1 sobre el bienestar de las vacas lecheras y su presencia en productos lácteos. *Nutrición Animal Tropical*. 14(2): 156-186
- Rao, K; Vipin, A; Venkateswaran. 2020. Molecular profile of non-aflatoxigenic phenotype in native strains of *Aspergillus flavus*. *Archives of Microbiology*. 1-13.
- Ritter, A; Hoeltz, M; Noll, I. 2011. Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*. 31(3):623-628.
- Romero, R.; Fernández, J; Plaza, P; Garrido, A; Martínez, J. (2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española Salud Pública*. 81: 461-474.

- Samson, R; Visagie, C; Houbraken, J; Hong, S; Hubka, V; Klaassen, C; Perrone, G; Seifert, K; Susca, A; Tanney, J; Varga, J; Kocsubé, S; Szigeti, G; Yaguchi, T; Frisvad, J. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*. 78:141-173.
- Serrano, H; Cardona, N. 2015. Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Revista CES Medicina*. 29 (1): 143-151.
- Soriano, J. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. España, Ediciones Díaz de Santos. 42 p.
- Streit, E; Naehrer, K; Rodrigues, I; Schatzmayr, G. 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(12): 2892-2899.
- Tafesse, F; Addisie, B; Zheng, Y; Nie, C; He, M; Liu, Y. 2021. Distribution of *Aspergillus* Fungi and Recent Aflatoxin Reports, Health Risks, and Advances in Developments of Biological Mitigation Strategies in China. *Toxins*. 13 (678): 1-31.
- Thathana, M; Murage, H; Luther, A; Pillay, M. 2017. Morphological characterization and determination of Aflatoxin-production potentials of *Aspergillus flavus* isolated from Maize and soil in Kenya. *Agriculture*. 7 (80): 2-14.
- Valerín, J. S.F. Informe situacional granos básicos: 2012-2019: Frijol-Maíz (en línea). Consultado 20 oct. 2021. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E16-11088.pdf>
- Valerín, J. 2021. Situación nacional de granos básicos en Costa Rica (teléfono). San José, Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Weather Spark. S.F. El clima y el tiempo promedio en todo el año en San Isidro Costa Rica (en línea, sitio web). Consultado 14 ene. 2022. Disponible en <https://es.weatherspark.com/y/16145/Clima-promedio-en-San-Isidro-Costa-Rica-durante-todo-el-a%C3%B1o>
- Wei, D; Zhou, L; Selvaraj, J; Zhang, C; Xing, F; Zhao, Y; Wang, Y; Liu, Y. 2014. Molecular characterization of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates collected in China. *Journal of Microbiology*. 52(7): 559-565.

- World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. 1993. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 56: 1-599.
- Yu, J; Woloshuk, C; Bhatnagar, D; Cleveland, T. 2000. Cloning and characterization of avf A and omt B genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene*. 248: 157-167.
- Zahra, N; Jamil, N; Rashid, S; Khalid, M; Kalim, I; Sheikh. 2019. A review of mycotoxin types, occurrence, toxicity, detection methods and control. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B*. 62B: 206-218.
- Zain, M. 2010. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15: 129-144.