



Identificación morfológica de hongos micotoxigénicos en accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.) de la costa y sierra peruana

Morphological identification of mycotoxigenic fungi in accessions of quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) of the peruvian coast and sierra

Jeniffer Guarniz-Benites; Jenny Del Carmen Valdez-Arana*

Facultad De Industrias Alimentaria, Universidad Nacional Agraria La Molina. Apartado postal 12-056 - Av. La Molina s/n, La Molina, Lima, Perú.

Received September 2, 2018. Accepted April 29, 2019.

Resumen

El objetivo de la investigación fue identificar mohos micotoxigénicos en acciones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivadas en la Costa (Lima) y la Sierra (Huancayo). El contenido de humedad (9.22-15.89%) y el contenido de saponinas (0,17-1,67%) no mostró diferencias significativas entre las accesiones de Costa y Sierra. La cuantificación de mohos en las accesiones de Costa mostró recuentos altos (75×10^4 - 10×10^4 ufc/g) y bajos en la Sierra (50-150 est. ufc/g), siendo estadísticamente diferentes. Existe una relación lineal negativa entre el contenido de saponinas y el recuento de mohos y levaduras en ambos grupos de accesiones de quinua. Los géneros identificados en Costa incluyen: *Cladosporium* (40%), *Penicillium* (30%), *Aspergillus* (20%) y *Trichotecium* (10%) y en Sierra: *Cladosporium* (50%), *Penicillium* (14%), *Talaromyces* (14%), *Aspergillus* (7%), *Alternaria* (7%) y *Oidium* (7%). Las aflatoxinas totales para *Aspergillus ochraceus* (100H53) fue 2,2 ppb y para *Aspergillus fumigatus* (235H70) fue 1,1-1,6 ppb. La ocratoxina A para *Aspergillus ochraceus* (100H53) fue de 3,7-18,1 ppb y para *Penicillium verrucosum* (53H43 y 53H45) fue de 1,0 y 1,1 ppb respectivamente. Las fumonisinas para *Alternaria alternata* (100H53) fue 0,2 ppm por lo que todos los mohos mencionados se consideran micotoxigénicos condición que permite establecer condiciones de control y prevención en alimentos.

Palabras clave: quinua; saponina; *Aspergillus*; *Penicillium*; micotoxinas.

Abstract

The objective of the research was to identify mycotoxigenic molds in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), Quinoa seeds were sown in the Coast (Lima) and the Sierra (Huancayo). The moisture content (9.22-15.89%) and the content of saponins (0.17- 1.67%) showed no significant differences between the accessions of Costa and Sierra. The quantification of molds in the Costa accessions showed high counts (75×10^4 - 10×10^4 cfu/g) and low counts in the Sierra (50-150 est. cfu/g), being statistically different. There is a negative linear relationship between the content of saponins and the count of molds and yeasts in both groups of accessions of quinoa. The genera identified in Costa include: *Cladosporium* (40%), *Penicillium* (30%), *Aspergillus* (20%) and *Trichotecium* (10%) and in Sierra: *Cladosporium* (50%), *Penicillium* (14%), *Talaromyces* (14%), *Aspergillus* (7%), *Alternaria* (7%) and *Oidium* (7%). The "total aflatoxins" for *Aspergillus ochraceus* (100H53) was 2.2 ppb and for *Aspergillus fumigatus* (235H70) it was 1.1-1.6 ppb. The "ochratoxin A" for *Aspergillus ochraceus* (100H53) was 3.7-18.1 ppb and for *Penicillium verrucosum* (53H43 and 53H45) it was 1.0 and 1.1 ppb respectively. The "fumonisins" for *Alternaria alternata* (100H53) was 0.2 ppm, so all the mentioned molds are considered to be mycotoxigenic conditions that allow to establish conditions of control and prevention in foods.

Keywords: quinoa; saponin; *Aspergillus*; *Penicillium*; mycotoxins.

How to cite this article:

Guarniz-Benites, J.; Valdez-Arana, J. 2019. Identificación morfológica de hongos micotoxigénicos en accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la costa y sierra peruana. Scientia Agropecuaria 10(3): 327 – 336.

* Corresponding author
E-mail: jvaldez@lamolina.edu.pe (J. Valdez-Arana).

1. Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa* W.) es considerada por la FAO como uno de los cultivos promisorios para la humanidad, cultivo estratégico para la seguridad y soberanía alimentaria debido a su calidad nutritiva, amplia variabilidad genética en los países andinos, adaptabilidad a condiciones adversas y bajo costo de producción, la creciente demanda en los últimos años ha convertido al Perú en el primer productor y exportador mundial de quinua (Minagri, 2018). Sin embargo, el problema radica en la contaminación de los alimentos agropecuarios, la que puede darse por agentes biológicos (mohos y levaduras), residuos químicos (plaguicidas) y otros contaminantes (metales pesados y toxinas) que pueden superar los límites permitidos y poner en riesgo la salud de quien los consume, representar un obstáculo para el comercio nacional e internacional de los productos. En razón a lo expuesto y con el fin de establecer medidas de control que prevengan el desarrollo de mohos, el objetivo principal de la investigación fue identificar morfológicamente hongos micotoxigénicos en acciones de quinua, con diferente contenido de saponinas, cultivados en Costa y Sierra del Perú, mediante métodos morfológicos y bioquímicos.

2. Materiales y métodos

Materia prima

Acciones de quinua (5) provenientes de Lima (12°02'06"S 77°01'07"O): y (8) provenientes de Huancayo (12°04'00"S 75°13'00"O) con diferente contenido de saponinas (Tabla 3).

Programas informáticos: App Mycelium Touch Versión 1.0, Minitab 17 Versión 3.1 y Software R-project versión 2.12.2.

Métodos de ensayo

Caracterización de las accesiones de quinua: Determinación del contenido de saponinas: Método espectrofotométrico (Guzmán *et al.*, 2013). Determinación del contenido de humedad (AOAC, 2005).

Cuantificación de los mohos y levaduras: Métodos según Tournas *et al.* (2001).

Identificación morfológica de mohos: Se procedió al Recuento de esporas (Bustillo, 2010), Pruebas presuntivas en medios nutritivos: a) Caracterización microscópica (Mossel *et al.*, 2003), b) Caracterización macroscópica mediante el empleo de Sistemas de identificación según género del moho: *Aspergillus*: Pitt (1997); *Penicillium*: Pitt (1973); *Alternaria*: Carrillo (2003), basados en el empleo de distintas temperaturas y medios de cultivo. La identificación de género se realizó según la "Illustrated genera of imperfect fungi" (Barnett y Hunter, 1998) y para la identificación macroscópica de las especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* se emplearon las claves taxonómicas según la Tabla 1.

Determinación de micotoxinas

Las cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* se sembraron en agar PDA para la producción de esporas (Gato, 2010). Las suspensiones de 10⁵ esporas/ml se inocularon en medios inductores de micotoxinas (CREA, YES, CYA y G25N) (Visagie *et al.*, 2014a). Se realizó la extracción de Ocratoxina A, Aflatoxinas Totales y Fumonisinias siguiendo Bragulat *et al.* (2001), Reddy *et al.* (2009), Aboul-Nasr y Obied-Allah (2013) (Tabla 2). Las micotoxinas fueron cuantificadas según el kit Veratox® (Neogen Corporation, 2015).

Tabla 1

Claves taxonómicas para la identificación de cada género y especie de moho

Género	Fuente de la clave taxonómica de referencia
<i>Alternaria</i>	Frisvad <i>et al.</i> (2004); Carrillo (2003); Barnett y Hunter (1998)
<i>Aspergillus</i>	Visagie <i>et al.</i> (2014b); Barnett y Hunter (1998)
<i>Penicillium</i>	Visagie <i>et al.</i> (2014a); Yilmaz <i>et al.</i> (2014); Pitt y Hocking (2009); Samson <i>et al.</i> (2014); Frisvad <i>et al.</i> (2004); Carrillo (2003); Samson y Pitt (1990); Barnett y Hunter (1998); Pitt (1973); Wang y Chan (2015)
<i>Talaromyces</i>	Yilmaz <i>et al.</i> (2014); Pitt y Hocking (1997); Pitt (1973); Stolk y Samson (1972)
<i>Trichotecium</i>	Pitt y Hocking (2009)
<i>Oidium</i>	Gonzales <i>et al.</i> (2010); Barnett y Hunter (1998)
<i>Cladosporium</i>	Tasic y Miladinovic (2007); Barnett y Hunter (1998)

Tabla 2
Medios y condiciones de incubación para inducción de micotoxinas

Género	Medios de cultivo: Agar	Condiciones de incubación	Criterio de presencia de cepas micotoxigénicas	Fuente
<i>Penicillium</i>	CREA (creatina sucrosa, pH = 8,0)	T = 27 °C y 7 días	Viraje de color del agar púrpura a amarillo (Visagie <i>et al.</i> , 2014a).	Carrillo (2003); Visagie <i>et al.</i> (2014a)
<i>Aspergillus</i>	YES (extracto de levadura sucrosa, pH 6,5)	T = 27 °C y 7 días	Color marrón al reverso del medio.	Gqaleni <i>et al.</i> (1996); Fente <i>et al.</i> (2001); Leontopoulos <i>et al.</i> (2002); Carrillo (2003); Ritter <i>et al.</i> (2011)
	CYA (czapeck levadura, pH 6,2)	T = 25 °C y 7 días	Presencia de pigmentación.	
<i>Alternaria</i>	G25N (czapeck glicerol) y CYA (czapeck levadura) pH 6,2	T = 25 °C y 30 días	---	Carrillo (2003); Aboul-Nasr y Obied-Allah (2013)

Tabla 3
Recuento de mohos y levaduras, contenido de humedad y saponina en accesiones de quinua de costa y sierra

Región	Accesiones de Quinua	Humedad (%)		Saponinas (%)	Clasificación (% Saponina)	UFC/g
		bh	bs			
Costa	Q-53 Choqllos quinua	12,20	13,9	0,17	Amarga	75*10 ⁴
	Q-40 Yuraq quinua	10,88	12,21	0,25	Amarga	64*10 ⁴
	Q-110 Choqllos quinua	12,64	14,47	0,97	Amarga	50*10 ⁴
	Q-89 Yuraq ayti	10,33	11,52	1,08	Amarga	13*10 ⁴
	Q-100 Choqllos de Anta	11,30	12,74	1,25	Amarga	10*10 ⁴
	Promedio	11,47	13,90	0,74	-	-
Sierra	Q-240 Oqe puka quinua	8,44	9,22	0,52	Amarga	150*
	Q-235 Yuraq quinua	11,31	12,75	0,99	Amarga	100*
	Q-209 Q'ello choqllos	13,71	15,89	0,47	Amarga	150*
	Q-250 Choqllos	8,52	9,31	0,65	Amarga	100*
	Q-245 Oqe quinua	8,76	9,60	0,71	Amarga	50*
	Q-242 Q'ello quinua	8,84	9,70	1,66	Amarga	50*
	Q-253 Yuraq ayti	9,44	10,42	1,67	Amarga	50*
	Q-248 Q'ello quinua	10,99	12,35	1,31	Amarga	50*
	Promedio	10,00	12,16	0,89	-	-

(*) Estimado.

3. Resultados y discusión

Caracterización de accesiones de quinua: contenido de humedad y saponinas

El contenido de humedad en base seca de las accesiones de quinua de la Costa estuvo en el rango 11,52 a 14,47% y de la Sierra, entre 9,22 a 15,89% (Tabla 3). Se observa que dichos valores cumplen con lo establecido por INACAL (2014), excepto en Q-100 (12,74%), Q-53 (13,90%) y Q-110 (14,47%) procedentes de la Costa; y Q-235 (12,75%) y Q-209 (15,89%) procedentes de la Sierra. Las pruebas de distribución no paramétricas de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,1259$), de Conover ($p = 0,0545$) y U de Mann ($p = 0,171$), según Berlanga y Rubio (2012), mostraron que no existen diferencias significativas entre el contenido de humedad de las accesiones de quinua de Costa y Sierra.

Todas las accesiones presentaron un contenido de saponina mayor a 0,39 por ciento (Tabla 3), que coinciden con lo reportado por Ahumada *et al.* (2016) en quinuas de América Latina. Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,5859$), de Conover ($p = 0,8388$) y U de Mann Whitney ($p = 0,4351$) (Berlanga y Rubio, 2012), muestran que no existen diferencias signifi-

cativas entre los contenidos de saponinas de las accesiones de quinua procedentes de la Costa con Sierra. Sin embargo, García-Parra *et al.* (2018) señala que el contenido de saponinas depende de la variedad, condiciones del suelo y clima. Las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo, generan efectos sobre la síntesis de metabolitos, tales como las saponinas. Algunos estudios muestran el efecto de la salinidad e irrigación con el contenido de saponinas.

Cuantificación de mohos y levaduras

El contenido de mohos y levaduras de las accesiones de la Costa ($10*10^4$ - $75*10^4$ ufc/g) fueron mayores a los de la Sierra (50-150 est. ufc/g) (Tabla 3). Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,004251$), de Conover ($p = 0,002088$) y U de Mann Whitney ($p < 2,2e^{-16}$) indica que el lugar de procedencia de las accesiones de quinua ejerció efecto en el recuento de mohos y levaduras (ufc/g) entre las accesiones de quinua de Costa y Sierra. Esta disminución en la carga microbiana es una estrategia adaptativa para mitigar los cambios ambientales como lo señalan Gonzales *et al.* (2017).

Al determinar la relación entre el contenido de saponinas (%) y el contenido de mohos y levaduras en las accesiones de quinua de Costa y Sierra empleando regresión lineal (Tabla 3 y Figura 1), se encontró que existe una relación lineal con pendiente negativa ($R^2 = 0,84$) en el caso de las accesiones de quinua de la Costa, y para el caso de la sierra con mayor dispersión para un $R^2 = 0.60$, que concuerda con lo reportado por Apaza *et al.* (2016), Pappier *et al.* (2008) y Stuardo y San Martin (2008).

Identificación morfológica de mohos

En la Figuras 2 se muestra la distribución porcentual de los géneros de mohos identificados, provenientes de las accesiones de quinua de Costa y Sierra.

Los géneros de mayor incidencia en la Costa correspondieron a *Cladosporium* (40%), *Penicillium* (30%), *Aspergillus* (20%) y *Trichotecium* (10%), mientras que los géneros de mayor incidencia en la Sierra correspondieron a *Cladosporium* (50%), *Penicillium* (14%), *Talaromyces* (14%), *Aspergillus* (7%), *Alternaria* (7%) y *Oidium* (7%). Se evidencia que los géneros comunes en ambas regiones fueron los géneros *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillum*.

Identificación morfológica del género *Alternaria* (cepa 245H2)

Las principales características morfológicas se observan en la Tabla 4.

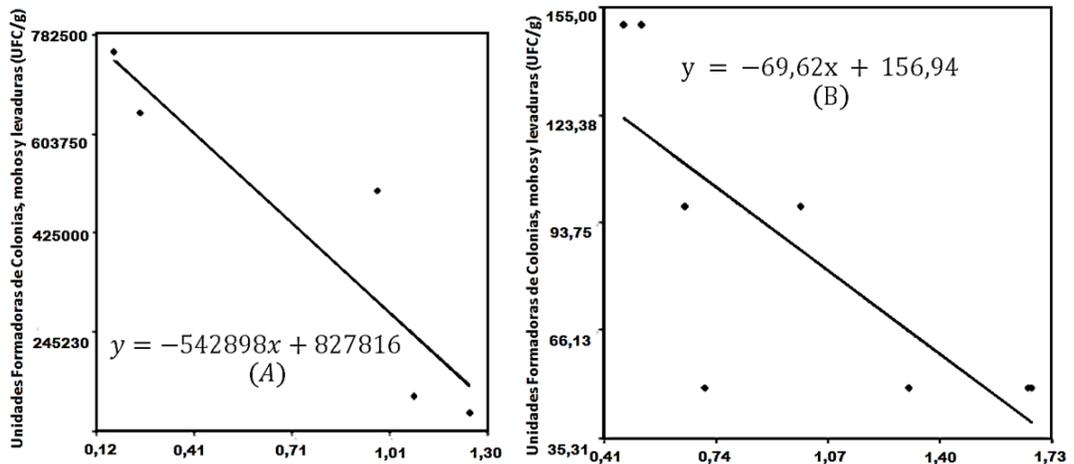


Figura 1. Relación entre el contenido de saponinas (%) y contenido de mohos y levadura en las accesiones de quinua de la Costa y Sierra.

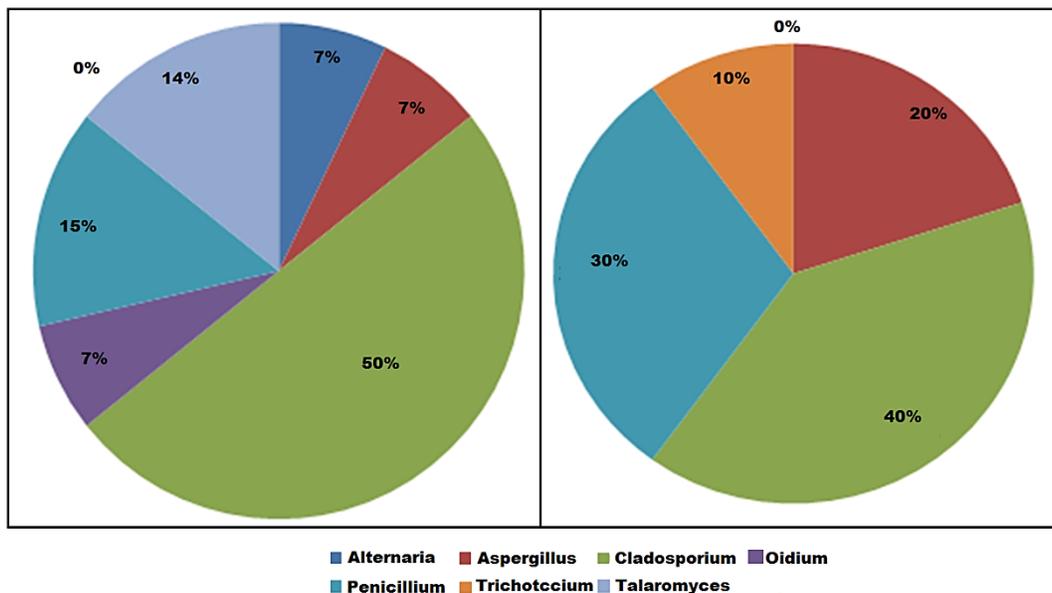


Figura 2. Distribución de género de mohos aislados e identificados de la Costa y Sierra.

Tabla 4

Características macro y microscópicas de mohos del género *Alternaria* aislados de accesiones quinua de Costa y Sierra

Características macroscópicas	Características microscópicas	Referencia
<p>En agar PDA las colonias de cuatro centímetros de diámetro. A los tres días de incubación, de color verde oscuro, con micelio aéreo color gris claro. El envés de color negro, con borde blanco y un anillo interno blanco.</p> <p>En CYA diámetro de 30 a 35mm de diámetro, con micelio poco denso y colonias chatas ligeramente algodonosas. El micelio aéreo fue gris verdoso con reverso negro parduzco.</p> <p>En Czapek-Glicerol (G25N) la colonia presentó de color pardo oliva, de 15 a 20 mm de diámetro en una semana a 27 °C, con micelio poco denso.</p>	<p>Los conidios presentaron la forma característica de “granada”, con septos transversales, longitudinales y oblicuos.</p> <p>Se observaron más de diez conidios ramificados a partir de conidióforos cortos, los cuales presentan una apariencia en forma de “v”.</p> <p>Presenta hifas septadas. Las cadenas de conidios de aspecto densos.</p>	<p>Frisvad <i>et al.</i> (2004); Carrillo (2003); Barnett y Hunter (1998)</p>

Tabla 5

Características macro y microscópicas de los mohos del género *Aspergillus* aislados de accesiones quinua de Costa y Sierra

	100H53 (Costa) <i>Aspergillus ochraceus</i>	235H70 (Sierra) <i>Aspergillus fumigatus</i>
Macroscópicas (a 27 °C y siete días de incubación)	<p>En PDA: Colonia con anverso amarillo-limón, algodonoso y esclerotia. Envés amarillo pálido.</p> <p>En CYA: Diámetro 53mm. Micelio aereo blanco ligeramente rosado. Reverso blanquecino en el borde y centro color pelirrojo con surcos concéntricos.</p> <p>En MEA: Diámetro 55 mm. Colonia crema-blanquecino con esclerotia. Reverso amarillo mostaza- marrón.</p> <p>En CY20S: Diámetro de 23 a 27mm. Colonia blanco algodonoso, reverso blanco de centro amarillento.</p> <p>En YES: Diámetro de 55 a 72mm, colonia blanca algodonosa compacta, reverso marrón.</p> <p>En CREA: La colonia presentó poco desarrollo, fue esporulada y blanca. Sin producción de ácido.</p>	<p>En PDA: Colonias pulverulentas, de centro verde azulado, borde blanco, nohubo exudado.</p> <p>En CYA: Diámetros de 45 a 48 mm. Colonia de color verde-grisáceo; micelio blanco; textura aterciopelada, reverso de centro amarillento, elevación plana.</p> <p>En MEA: Colonias de color verde grisáceo de aspecto vetulinoso, micelio blanco; reverso amarillo pálido.</p> <p>En CY20S: Diámetro de 35 a 50mm; de color verde grisáceo; micelio blanco; reverso amarillento; de textura aterciopelada, elevación placa.</p> <p>En YES: Colonia verde muy pulverulento (denso), alcanzó un diámetro de 45mm, ondulaciones radiales. Reverso mostaza.</p>
Microscópicas	<p>En PDA en cámara húmeda. Los conidios globosos finamente rugosas, de menos de 1 µm de diámetro; las hifas de apariencia rugosa; estipe de 1.2µm de diámetro; conidióforo de 3.5 µm, las cabezas de los conidios irradian de cadenas de conidios, que parten de una vesícula globosa; fiálides de 5 µm.</p>	<p>Las cabezas conidiales fueron uniseriadas y columnares; superficie lisa; conidióforos de cinco micrómetros (µm) de largo y 2 micrómetros (µm) de ancho; vesícula en forma de cuchara de 10 µm de ancho; las fiálides ocupan los dos tercios de la vesícula. Los conidios son globosos, lisos o ligeramente rugosos de 1 µm.</p>
Referencia	Visagie <i>et al.</i> (2014b); Frisvad <i>et al.</i> (2004)	Abarca (2000)

Investigaciones recientes han demostrado la incidencia de *Alternaria alternata* en quinua (Gonzales *et al.*, 2017), que produce alergias por hipersensibilidad; es probablemente la especie productora de micotoxinas más importante (Pavón, 2012), entre ellas las Fumonisin (Abbas *et al.*, 1996; Mirocha *et al.*, 1996).

Identificación morfológica del género *Aspergillus*

Las principales características morfológicas se observan en la Tabla 5.

Cepa 100H53: Identificada como *Aspergillus ochraceus*, especie aislada de la accesión Q100. Es una especie fuertemente productora de Ocratoxina A (Santos-Cisconá *et al.*, 2019).

Identificación de especies del género

Penicillium:

Cepas 248 H3: Identificada como *Penicillium brocae*.

Cepas 248 H4: Identificada como *Penicillium steckii*.

Cepa 248 H5: Identificada como *Penicillium citrinum*.

Cepa 240 H 25 y 240H27: Identificadas como *Talaromyces wortmannii*.

Cepa 53H40, 53H43, 53H45, 100H55 y 100H56: Identificada como *Penicillium verrucosum*.

Identificación de otros géneros de mohos:

Cepa 240 H 25 y 240H27: Identificada como *Talaromyces wortmannii*.

Cepa 89H48: Identificada como *Trichotecium sp.*

Cepa 209H9: Identificada como *Oidium sp.*

Tabla 6Características macro y microscópicas de mohos del género *Penicillium* aislados de accesiones quinua de Costa y Sierra

Especie identificada	Características macroscópicas	Características microscópicas
248 H3- <i>Penicillium brocae</i>	En PDA: Colonias verde turquesa, pulvurulenta, borde blanco y envés amarillo pálido. En CYA: Diámetro de 23- 26 mm, arrugado, velutinoso; micelio blanco. Reverso blanquecino. En CYA: A 5 °C no hubo crecimiento, a 37 °C: Diámetro menor a 10 mm, color blanco. En MEA: Diámetro 22 mm, verde salvia, pulvurulento, plana, radialmente surcada sin exudado. En CREA: Diámetro 3-4 mm, verde oliva, pulvurulentas, bordes filamentosos y decoloración del medio.	Conidióforo monoverticilado (2,426 µm) y liso, las fialides (3) parten de un verticilio, las cuales tiene forma de botella (ampuliforme), los conidios son esféricas y elipsoidales, se observan tres cadenas de conidios (de dos a tres). El estipe presenta un septo. Siguiendo Wang y Chan (2015).
Cepa 248 H4- <i>Penicillium steckii</i>	En PDA: Colonias color verde turquesa, borde blanco y de forma regular. Envés amarillo pálido. En CYA: Diámetro 28 mm, plana, radialmente surcado, el micelio blanco. Exudado ausente. Reverso pálido amarillo. En CYA (5 °C): sin crecimiento, CYA (37 °C): < 10 mm de color blanco y en G25N: 16 a 20 mm. En MEA: Diámetro 22mm, color verde, pulvurulento, elevación plana, radialmente surcada. En CREA: Diámetro 3-4 mm, color verde, pulvurulentas, borde filamentosos, medio decolorado.	Conidióforo monoverticilado (2,5 µm) y liso, presenta un estipe que se subdivide en tres estructuras llamadas métulas y luego en fialides (3). Los conidios son esféricos y lisos, se observan cadenas de conidios. El estipe presenta un septo. Siguiendo Pitt (1973).
Cepa 248 H5- <i>Penicillium citrinum</i>	En CYA: Diámetro 22mm, radialmente surcada, zonas velutinosas, micelio blanco. Colonia turquesa grisáceo, reverso amarillo-parduzco, exudado amarillo. CYA (5°C): Sin crecimiento; CYA (37 °C): Diámetro 4 a 5mm. En G25N: Diámetro 11-18 mm. Colonia radialmente surcada, flocosa en el centro; micelio blanco; de color verde. En MEA: Diámetro 21 mm, micelio blanco; formación de conidios azulados, borde blanco, reverso marrón pálido. En CREA: Diámetro 10 a 16 mm, verde oliva, pulvurulentas, irregular, decoloración del medio a amarillo-avejorro.	Los conidióforos surgen de la hifa, de paredes lisas, biverticilado con 3 a 4 métulas vesiculadas y divergentes, es decir que parten de un verticilio, métulas con menos de 1 µm de longitud, presenta fialides con forma de frasco o botella (ampuliforme), los conidios son globosos y de paredes lisas. Las columnas de conidias están bien definidas. Siguiendo Pitt (1973); Samson y Pitt (1990); Carrillo (2003); Pitt y Hocking (2009).
Cepa 53H40, 53H43, 53H45, 100H55 y 100H56- <i>Penicillium verrucosum</i>	En PDA: Colonia es blanca algodonosa, color verde enebro, filamentosos de borde blanco, reverso verdoso pálido. En CYA: Diámetro de 13-18 mm, colonias verde salvia. Reverso amarillo. En CYA (5 °C) 0-1,5 mm En CYA (37 °C) pequeñas y filamentosas, < 1 mm. En MEA: Diámetro 22 mm, colonia de borde blanco algodonoso y cuerpo verde. En CREA: Diámetro 10 a 18 mm, de poco crecimiento, color verde salvia, sin producción de ácido	Estructura de <i>Penicillium</i> , esporas, hifas septadas, conidióforos con paredes finamente rugosas, el conidióforo es terverticiladas, esporas esféricas con paredes lisas, en cadenas. Siguiendo Frisvad y Samson (2004), Pitt y Hocking (2009).

Tabla 7

Curvas de calibración para micotoxinas para la prueba de ELISA

Prueba VERATOX®	Estándares	Límites de detección (ppb)	Ecuaciones	R ²
Aflatoxinas	0; 5; 15; 50	1,400	y = -2,12x + 1,75 (α) (CC 1) y = -2,34x + 2,47 (β) (CC 2)	0,99 0,99
Aflatoxinas HS	0; 1; 2; 4; 8	0,500	y = -1,97x + 0,66 (γ) (CC 3)	0,99
Ocratoxina	0; 2; 5; 10; 25	1,000	y = -1,88x + 1,18 (δ) (CC 4)	0,98
Fumonisinias	0;1; 2; 4; 6	0,200	y = -1,73x - 0,62 (ω) (CC 5)	0,99

y = Log (Concentración toxina); x= Ln (b/ (1-b)); b=ODS/OD0 (ODS: Densidad óptica de la toxina y OD0: Densidad óptica de la toxina cero). α, β, γ, δ y ω: Ecuaciones de los estándares y CC: Curva de calibración.

Determinación de Aflatoxinas totales (B1, B2, G1 y G2), ocratoxina A y fumonisinas

A fin de generar el contenido de micotoxinas, como etapa preliminar, se obtuvieron las curvas de calibración para los estándares de Aflatoxinas totales, Ocratoxina A y Fumonisinias, representadas por las ecuaciones y coeficiente de correlación (R²) (Tabla 7).

En la Tabla 8 se muestran que no hubo producción de aflatoxinas totales (B1, B2,

G1, G2) por las cepas de *Penicillium*: 248H3, 248H5, 240H25, 53H40, 53H43, 53H45, 100H54, 100H55, 100H56 y 110H62. Esto ocurrió debido a que las cepas identificadas como *P. brocae* (248H3 y 248H4), *P. steckii* (248H4), *T. wortmannii* (240H25 y 248H27) y *P. verrucosum* (53H40, 53H43 y 53H45) no son productoras de aflatoxinas (Peterson *et al.*, 2003; Visagie *et al.*, 2014b).

Tabla 8Densidad óptica (DO) y Concentración (ppb) de Aflatoxinas y Ocratoxinas cepas de *Aspergillus* y *Penicillium*

Código	Especie identificada	Aflatoxinas Totales		Ocratoxina A	
		DO	ppb	DO	ppb
248H3 P1	<i>Penicillium brocae</i>	2,646	0,3	1,305	0,4
248H3 P2		2,515	0,6	1,297	0,4
248H4 P1	<i>Penicillium steckii</i>	2,552	0,5	1,197	0,7
248H4 P2		2,458	0,8	1,231	0,6
248H5 P1	<i>Penicillium citrinum</i>	2,937	0,0	1,410	0,1
248H5 P2		2,764	0,1	1,457	0,0
240H25 P1	<i>Taloromyces wortmannii</i>	2,727	0,1	1,429	0,1
240H25 P2		2,650	0,3	1,521	0,0
240H27 P1		2,534	0,6	1,399	0,1
240H27 P2		2,541	0,5	1,419	0,1
53H40 P1	<i>Penicillium verrucosum</i>	2,563	0,5	1,467	0
53H40 P2		2,469	0,7	1,427	0,1
53H43 P1		2,930	0,0	1,102	1,1
53H43 P2		2,652	0,3	1,175	0,8
53H45 P3		2,807	0,0	1,000	1,7
53H45 P4		2,810	0,0	1,295	0,4
100H54 P1		1,777	3,7	1,133	1,0
100H54 P2		1,861	3,2	1,115	1,1
100H55 P1		1,806	3,5	1,254	0,5
100H55 P2		1,795	3,6	1,33	0,3
100H56 P1	1,918	2,9	1,197	0,7	
100H56 P2	1,927	2,8	1,275	0,5	
110H62 P1	<i>Penicillium</i> sp.	2,421	0,9	1,373	0,2
110H62 P2		2,480	0,7	1,278	0,4
100H53 YES	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,570	2,3	0,749	4,1
100H53 CYA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,135	0,0	0,350	17,8
F235H70 YES	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,636	1,7	1,376	0,2
235H70 CYA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,750	1,1	1,230	0,6
Control +	<i>A. flavus</i> en YES	0,901	0,5	-	-
Control -	<i>A. oryzae</i> en YES	1,141	0,0	-	-

En la **Tabla 8** se muestra que la cepa de *Aspergillus flavus* (control positivo) mostró ser positiva a la producción de Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) bajo las condiciones culturales establecidas, coincidiendo con lo reportado por Ritter *et al.* (2011), Reddy *et al.* (2009), Leontopoulus *et al.* (2002) y Fente *et al.* (2001). Mientras que *Aspergillus oryzae* (control negativo) resultó negativa a la producción de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂). Efectivamente esta especie es una “forma domesticada” de *A. flavus* y no es productora de aflatoxinas (Abarca, 2000). La cepa de *A. flavus* tuvo una producción de 0,5 ppb de aflatoxinas bajo las condiciones establecidas, coincidiendo con Ritter *et al.* (2011). Las cepas 235H70 (*Aspergillus fumigatus*) y 100H53 (*Aspergillus ochraceus*) resultaron ser positivas a la producción de Aflatoxinas totales (B₁, B₂, G₁ y G₂). La cepa 253H70 produjo 1,6 ppb de aflatoxinas (YES) y 1,1 ppb de aflatoxinas (CYA), coincidiendo por lo reportado por Abarca *et al.* (1997) respecto a la producción de aflatoxinas por las cepas de *A. fumigatus*. Mientras que *Aspergillus roseoglobulosus* produjo 2,2 ppb de aflatoxinas (YES) y 0,0 ppb de aflatoxinas (CYA). Los resultados muestran una mayor producción de aflatoxinas en el

medio YES comparada con CYA, coincidiendo con lo reportado por Ritter *et al.* (2011) y Reddy *et al.* (2009).

Asimismo, en la **Tabla 8** se muestra que los extractos de los medios de cultivo de *Penicillium*: 248H3, 248H5, 240H25, 100H55, 100H56 y 110H62 no generaron ocratoxina A en las condiciones establecidas para las cepas de *Penicillium* en agar CREA. La cepa 53H43 (*P. verrucosum*) produjo 0,1 ppb. La producción de la cepa 53H45 (*P. verrucosum*) fue 1,1 ppb, mientras que la producción de ocratoxina A de la cepa 100H54 (*Penicillium* sp.) fue de 1,1 ppb. Efectivamente, la capacidad de producción de Ocratoxina A de las cepas de *Penicillium verrucosum* bajo las condiciones establecidas, ha sido reportada por Pitt y Hocking (2009). Por otro lado, es probable que el contenido de Ocratoxinas aumente con el contenido de humedad de las accesiones de quinuas Q-53 (13,90%) y Q-100 (12,74%) (Ravelo *et al.*, 2011).

En la **Tabla 9** se observa que la producción de ocratoxina A de la cepa 100H53 (*A. ochraceus*) en el medio de cultivo YES (18,0 ppb) fue mayor que en el medio de cultivo CYA (4,0 ppb). Lo mismo ocurre con la producción de Ocratoxina A de la cepa 235H70 (*A. fumigatus*), en el medio de

cultivo YES (0,6 ppb) fue mayor que en el medio de cultivo CYA (0,3 ppb). Se evidenció que el mejor medio para la producción de ocratoxina A es el medio de cultivo YES, condición encontrada por Fente *et al.* (2001) y Ritter *et al.* (2011).

Tabla 9
Concentración de Fumonisinias en cepas de *Alternaria*

Código	Densidad Óptica (DO)	Fumonisinias (ppb)	Promedio (ppb)	Desviación Estándar
245H2 CYA	0,546	0,100	0,2	0,071
245H2 CYA	0,529	0,200		
245H2 G25N	0,646	0,000	0,0	0,000
245H2 G25N	0,648	0,000		

En la **Tabla 9** se observa que las concentraciones de la micotoxina en los extractos de los cultivos de *Alternaria*: 245H2 en CYA presentó valor superior al límite establecido por el método, siendo esta cepa toxigénica, coincidiendo con lo reportado por Abbas *et al.* (1996) y Mirocha *et al.* (1996).

4. Conclusiones

Se cuantificó el contenido de hongos presentes en granos de las 13 accesiones de quinua provenientes de la Costa (Lima) y Sierra (Huancayo). Las accesiones de quinua de la Costa presentaron un rango de 75×10^4 y 10×10^4 ; y las de la Sierra 50 y 150 estimado. La procedencia de las accesiones condicionó la cantidad y variedad de hongos. Los géneros *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* se presentaron en la Costa y Sierra. Mientras que el género *Trichotecium* se presentó exclusivamente de la Costa y los generos *Trichotecium*, *Talaromyces* y *Oidium* en la Sierra. El contenido de saponinas de las accesiones de quinua presentó una correlación negativa con el contenido de mohos y levaduras en accesiones de Costa y Sierra. La cuantificación de aflatoxinas para algunos de los mohos del género *Aspergillus*, en el medio de cultivo YES, presentó desde 0,6 a 2,2 ppb de aflatoxinas totales (50%), siendo estos toxigénicos; el otro 50% fue del tipo no toxigénico; en el medio de cultivo CYA presentó desde < 0,5 a 1,1 ppb de aflatoxinas totales (50 por ciento), siendo estos toxigénicos. La cuantificación de ocratoxina para algunos de los mohos del género *Penicillium*, en el medio de cultivo CREA presentó desde 1,0 a 1,1 ppb de ocratoxina A (25 por ciento), siendo estos toxigénicos. Para el género *Aspergillus*, en el medio de cultivo CYA

presentó desde < 1,0 a 3,7 ppb de ocratoxina A (50%), siendo estos toxigénicos. En el medio de cultivo YES presentó desde < 1,0 a 18,1 ppb de ocratoxina A (50 por ciento), siendo estos toxigénicos. La cuantificación de fumonisinas para el moho del género *Alternaria*, en el medio de cultivo CYA presentó 0,2 ppb de Fumonisinias (50%), siendo esta toxigénica; el otro 50% fue no toxigénico.

Agradecimientos

La presente investigación ha sido financiada por el Proyecto de Investigación Aplicada con Contrato N° 141-FINCYT-IA-2013 “Selección de ecotipos de quinua (*Chenopodium quinoa*) con mayor potencial nutricional, funcional, tecnológico, sensorial y menor contenido de saponinas, cultivados en costa y sierra”, del Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCYT) del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú).

ORCID

J. Valdez-Arana  <https://orcid.org/0000-0002-9592-6353>

Referencias bibliográficas

- Abarca, L.M.; Bragulat, R.M.; Catellá, G.; Accensi, F.; Cabañes, J.F. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 63-68.
- Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Accensi, F.; Cabañes, F.J. 1997. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *Journal of Food Protection* 60(12): 1580-1582.
- Abbas, H.K.; Duke, S.O.; Riley, W.T.; Kraus, G.A. 1996. The chemistry and biological activities of the natural products AAL-toxin and the fumonisin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 391: 293-308.
- Aboul-Nasr, M.B.; Obied-Allad, M.R.A. 2013. Biological and chemical detection of fumonisins produced on agar medium by *Fusarium verticillioides* isolates collected from corn in Sohag, Egypt. *Microbiology* 159: 1720-1724.
- Ahumada, A.; Ortega, A.; Chito, D.; Benítez, R. 2016. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas* 45(3): 438-469.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Apaza, R.; Smeltekop, H.; Flores, Y.; Almanza, G.; Salcedo, L. 2016. Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd. contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* sacc. *Revista de Protección Vegetal* 31(1): 63-69.
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth ed. Minnesota, EEUU. US: Burgess Publishing Company, APS. 241 pp.

- Berlanga, V.; Rubio, M.J. 2012. Clasificación de pruebas no paramétricas. Cómo aplicarlas en SPSS. REIRE, Revista d'Innovació i Recerca en Educació 5(2): 101-113.
- Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Cabañez, F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin a in pure culture. International journal of food microbiology 71: 139-144.
- Bustillo, A.E. 2010. Método para cuantificar suspensión de esporas de hongos y otros microorganismos. Reporte técnico. Universidad Nacional- Palmira curso Patología de insectos. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277870402_metodo_para_cuantificar_suspensiones_de_esporas_de_hongos_y_otros_organismos.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina. ISBN 987-9381-19-X. 118 pp.
- Fente, C.A.; Jaimez, J.I.; Vázquez, B.I.; Franco, C.M.; Cepeda, A. 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing aspergillus strains. Applied and environmental Microbiology 67(10): 4858-4862.
- Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and airborne terverticillate penicillia and their mycotoxins. Studies in mycology 49: 1-17.
- Frisvad, J.C.; Frank, M.J.; Houbraken, J.; Kuijpers, A.; Samson, R. 2004. New ochratoxin a producing species of aspergillus section circumdati. Studies in mycology. 50:23-43.
- García-Parra, M.A.; Plazas-Leguizamón, N.Z.; Carvajal, D.C.; Ferreira, S.K.; David, J. 2018. Descripción de las saponinas en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en relación con el suelo y el clima: una revisión. Informador Técnico 82(2): 241-249.
- Gato, C.Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma hazianum* rifai. Fitosanidad 14(3): 189-195.
- Gonzales, N.; Martínez, B.; Infante, D. 2010. Mildiu polvoriento en las cucurbitáceas. Protección Vegetal 25(1): 44-50.
- Gonzalez-Teuber, M.; Vilo, C.; Bascuñán-Godoy, L. 2017. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. Genomics Data 11: 109-112.
- Gqaleni, N.; Smith, J.E.; Lacey, J. 1996. Co-production of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *aspergillus flavus*. Food additives & contaminants 13(6): 677-685.
- Guzmán, B.; Cruz, D.L.; Alvarado, J.A.; Mollinedo, P. 2013. Cuantificación de Saponinas en muestras de Cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen. Revista Boliviana de Química 30(2): 131-136.
- INACAL (Instituto Nacional de Calidad - Perú). 2014. NTP 205.062:2014. Granos Andinos. Quinoa. Requisitos. 2 (ed). Lima. Perú. 28 dic 2014. 15 p.
- Leontopoulus, D.; Siafaka, A.; Makaki, P. 2002. Black olives as substrate for *aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin b production. Food Microbiology. 20: 119-126.
- MINAGRI (Ministerio Nacional de Agricultura y Riego - Perú). 2018. Manejo agronómico prácticas de conservación de suelos, producción, comercialización y perspectivas de granos andinos. Lima. Perú.
- Mirocha, C.J.; Chen, J.; Xie, W.; Xu, Y.; Abbas, H.J.; Hogge, L.R. 1996. Biosynthesis of fumonisin and aal derivatives by *alternaria* and *fusarium* in laboratory culture. Adv. Exp. Med. Biol. 392: 213-224.
- Mossel, D.; Moreno-García, B.; Struijk, C. 2003. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Neogen Corporation. 2015. Manual de Procedimientos. Disponible en: <http://www.Neogen.Com/En/>.
- Pappier, U.; Fernandez, V.; Larumbe, G.; Vaamonde, G. 2008. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). International Journal of Food Microbiology 125: 153-157.
- Pavón, M.A.; Gonzales, I.; Martín, R.; García, T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. Nutrición Hospitalaria 27(6): 1772-1781.
- Peterson, S.; Pérez, J.; Vega, F.E.; Infante, F. 2003. *Penicillium brocae*, a new species associated with the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. Mycologia 95(1): 141-147.
- Pitt, J.; Hocking, A.D. 1997. Fungi and spoilage: penicillium and related genera. Capítulo 7. Pag 203-338.
- Pitt, J.I. 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycologia 65(5): 1135-1157.
- Pitt, J.I.; Hocking A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3 rd. Springer Dordrecht Heidelberg. New York, EEUUAA.
- Ravelo, A.; Rubio, A.J.; Gutierrez, A.J.; Hardisson de la Torre 2011. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. Nutr Hosp. 26(6): 1215-1226.
- Reddy, K.R.N.; Abbas, H.K.; Abel, C.A.; Shier, W.T.; Oliveira, C.A.F.; Raghavender, C.R. 2009. Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. Toxin reviews 28(2-3): 154-168.
- Ritter, A.C.; Hoeltz, M.; Noll, I.B. 2011. Toxigenic potencial of *aspergillus flavus* tested in different culture conditions. Ciencia y tecnología de alimentos. Campinas 31(3): 623-628.
- Samson, R.A.; Pitt, J.I. 1990. Modern concepts in penicillium and aspergillus classification. Springer science+business media New York. EEUU.
- Samson, R.A.; Visagie, C.M.; Houbraken, J.; Hong, S.B.; Hubka, V.; Klaassen, H.W.; Perrone, G.; Seifert, K.A.; Susca, A.; Tanney, J.B.; Varga, J.; Kocsubé, S.; Szigeti G.; Yaguchi, T.Y.; Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *aspergillus*. Studies in mycology 78: 141-173.
- Santos-Ciscon, V.A.; 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.
- Stolk, A.C.; Samson, R.A. 1972. The Genus *Talaromyces* Studies on *Talaromyces* and related genera II. *Studies in Mycology* 2: 1-65.
- Stuardo, M.; San Martin, R. 2008. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) alkali treated saponins against botrytis cinérea. *Industrial crops and products* 27: 296-302.
- Tasic, S.; Miladinovic, N. 2007. *Cladosporium* spp. cause of opportunistic mycoses. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 24(1): 15-19.
- Tournas, V.; Stack, M.E.; Mislivec, P.B.; Koch, H.A.; Bandler, R. 2001. *Bacteriological analytical manual: BAM, yeast, molds and mycotoxins*. 8th Edition. FDA. EEUU.
- Visagie, C.M.; Houbraeken, J.; Frisvad, J.C.; Hong, S-B.; Klaassen, H.W.; Perrone, G.; Seifert, K.A.; Varga, J.; Yaguchi, T.; Samson, Ra. 2014a. Identification and nomenclature of the genus *penicillium*. *Studies in mycology* 78: 343-371.
- Visagie, C.M.; Hirooka, Y.; Tanney, J.B; Whitfield, E; Mwange, K.; Meijer, M.; Amend, A.S.; Seifert, K.A.; Samson, R.A. 2014b. *Aspergillus, Penicillium and Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology* 78: 63-139.
- Wang, Y-Z.; Chan, M-L. 2015. A *Penicillium* and a *Talaromyces* Nw to Taian. *Coll. And Res.* 28: 1-4.
- Yilmaz, N.; Visagie, C.M.; Houbraeken, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 2014. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology* 78: 175-341.