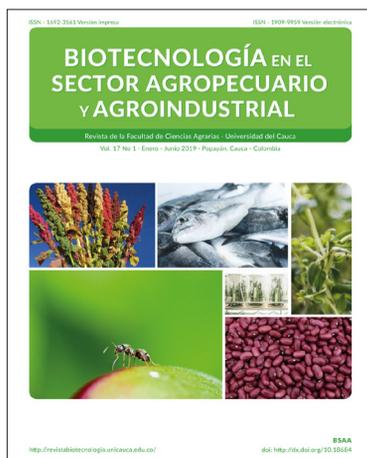




Universidad
del Cauca



ISSN: 1692-3561 Versión Impresa ISSN: 1909-9959 Versión Electrónica

BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL

Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad del Cauca

Vol. 17 No 1 - Enero - Junio 2019 - Popayán, Cauca - Colombia



<http://revistas.biociencia.unicauca.edu.co/> doi: <http://dx.doi.org/10.1006/04> EISA

FOTOS DE PORTADA
Biodiversity International - Flickr
Unsplash



Dirección Revista
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad del Cauca
Calle 5 No.4-70 Popayán, Colombia
Teléfono: 311 768 15 72
e_mail de contacto, suscripciones e intercambio:
biotecnofaca@unicauca.edu.co
biotecnofaca2009@gmail.com

Página web e inscripciones:
<http://revistas.unicauca.edu.co/>

Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial publica un volumen cada año con dos ediciones:
Primera: Enero - Junio
Segunda: Julio - Diciembre
- VRI - Vicerrectoría de Investigaciones
Universidad del Cauca

Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial

Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad del Cauca

ISSN - 1692-3561
Versión Impresa



ISSN-e 1909-9959
Versión Electrónica

Universidad
del Cauca

Vol. 17 No 1 - Enero - Junio 2019

Héctor Samuel Villada - Ph.D.
Editor de la Revista

COMITÉ EDITORIAL

Silvio Andres Mosquera M. Sc. Universidad del Cauca Departamento de Agroindustria	Ángel Pérez - Ph. D. Universidad de Holguín de Cuba
Sandra Morales Velasco M.Sc. Universidad del Cauca Departamento de Ciencias Agropecuarias	José Ángel Gómez Ruiz - Ph.D Universidad Autónoma de Madrid, España
Consuelo Montes M. Sc. Universidad del Cauca Departamento de Ciencias Agropecuarias	Henry Armando Jurado Gámez - Ph.D. Universidad de Nariño
Diana Paola Navia, M. Sc. Universidad San Buenaventura Cali, Colombia	Jaime Ricardo Rosero Noguera - Ph.D. Universidad Nacional - Sede Medellín
Jhon Wilder Zartha S. - M. Sc. Universidad Pontificia Bolivariana (UPB)	
Michael Peters - Ph.D. Universidad de Giessen - CIAT	

COMITÉ CIENTÍFICO

Nelson Vivas Quila - Ph. D. Universidad del Cauca Departamento de Ciencias Agropecuarias	Byong Lee - Ph. D. Universidad de McGill de Canadá
Misael Cortés Rodríguez - Ph. D. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín	Francisco J. Moreno Andújar - Ph.D. Instituto de fermentaciones industriales Madrid, España
Alfredo Ayala Aponte Ph. D. Universidad del Valle Escuela de Ingeniería de Alimentos	Maria del Mar Villamiel G. Ph.D. Universidad Complutense de Madrid
Xuebing Xu - Ph. D. Biocentrum. Instituto de Biotecnología de Dinamarca	
Vijaya Raghavan - Ph. D. Universidad de Mcgill de Canadá	

Asistente Editorial
Willian Enrique Sotelo O.

Diseño y Diagramación
Área de Desarrollo Editorial
Universidad del Cauca

Impresión
SAMAVA
Popayán - Colombia



UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Rector
José Luis Diago Franco

Vicerrector Académico
Luis Guillermo Jaramillo Echeverry

Vicerrectora Administrativa
Cielo Pérez Solano

Vicerrector De Investigaciones
Héctor Samuel Villada Castillo

Vicerrector De Cultura Y Bienestar
Deibar René Hurtado

Secretaría General
Laura Ismenia Castellanos Vivas

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Decano
Luis Alfredo Londoño Vélez

Secretaría General
Tania Maritza Pabón Ruíz

Jefe Departamento Agroindustria
Juan Fernando Vergara

Jefe Departamento Ciencias Agropecuarias
Roman Stechauner Roninger

Coordinador Programa Ingeniería Forestal
José Franco Alvis Gordo

Coordinador Programa De Ingeniería Agroindustrial
José Fernando Solanilla

Coordinador Programa De Ingeniería Agropecuaria
Victor Felipe Terán Gómez

Coordinador Programa De Tecnología Agroindustrial
Raquel Eugenia de la Cruz Noguera

Universidad del Cauca Facultad de Ciencias Agrarias Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial

✦ INFORMACIÓN GENERAL

La Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial es una publicación con periodicidad semestral, arbitrada, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, que acepta trabajos originales e inéditos producto de investigación en el campo de la ciencia, la ingeniería y la tecnología que tengan un impacto en el sector agrario regional, nacional e internacional en temas como Agroindustria alimentaria y no alimentaria, Ciencias agrícolas y pecuarias, Ciencias Forestales, Energía y Medio Ambiente, Computación Aplicada, Biotecnología, Equipos y Procesos, Administración Industrial, en idiomas español (idioma sugerido para mayor visibilidad y factor de impacto), inglés y portugués.

✦ POLÍTICAS EDITORIALES

Compromiso de tipo formal. Con la remisión del manuscrito postulado para evaluación y publicación, el (los) autor(es) acepta(n) la totalidad de las condiciones estipuladas en las normas.

Compromiso de tipo ético. Los autores deben establecer, por escrito, un compromiso de tipo ético en cuanto a la originalidad del manuscrito postulado: *“El autor(es) firmante(s) declara que el manuscrito presenta resultados originales de una investigación, que no han sido publicados ni están siendo considerados para publicación en otra revista, ajustándose además a las normas éticas internacionales de propiedad intelectual y autoría”*. En la carta se deben incluir los datos personales de cada uno de los autores: nacionalidad, escolaridad, correo electrónico institucional, teléfonos para su ubicación o dirección postal y filiación institucional, o en su defecto, la dirección Web donde pueden ser consultados.

Derechos de Autor. Con el envío de los trabajos, los autores(as) conceden “Derechos de Autor” a la revista, por lo que los trabajos no pueden tener derechos otorgados a terceros, a la fecha de envío. La concesión de Derechos de Autor significa la autorización para que la revista pueda hacer uso del manuscrito, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica- tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectarán la propiedad intelectual que es propia de los(as) autores(as).

✦ PROCESO GENERAL

Envío de manuscritos. El texto completo de los trabajos en formato Word más la carta de presentación y la información de los evaluadores sugeridos (dos pares nacionales y dos internacionales), deben remitirse por correo electrónico (biotecnofaca@unicauca.edu.co o biotecnofaca2009@gmail.com) o por intermedio de la plataforma Open Journal System (OJS), luego del registro como usuario.

Proceso de evaluación. El proceso inicia con la revisión por parte del Comité Editorial que se reserva el derecho de rechazar un manuscrito (decisión definitiva e inapelable) que presente deficiencias en estructura y redacción y que no cumpla con las áreas temáticas, las normas de publicación y referencias pertinentes o sugerir modificaciones con el objeto de lograr una mejor calidad. Los trabajos aceptados se evaluarán a ciegas, por dos (2) árbitros expertos en el área de conocimiento, quienes emitirán un concepto detallado sobre la pertinencia y atractivo científico y tecnológico, la rigurosidad del tratamiento del tema, el ajuste a las normas de la revista y su contribución al desarrollo de la ciencia, la ingeniería y la tecnología. Por ningún motivo se permitirá la evaluación simultánea de más de dos manuscritos por un autor proponente.

Si el concepto de los dos árbitros coincide, el Editor-Jefe acepta o rechaza el manuscrito. Si no coincide, se busca el concepto de un tercer árbitro: si es rechazado, el manuscrito y las observaciones de los árbitros se remiten a los autores para que consideren su publicación en otro medio. Si el manuscrito es aceptado con modificaciones menores o mayores, éste y las observaciones de los árbitros se remiten a los autores para que éstos remitan una versión revisada y corregida en máximo 20 días, acompañada de una carta dirigida al Editor-Jefe enumerando detalladamente los cambios realizados con base en las observaciones de los árbitros: será el Editor-Jefe quien decida sobre la aceptación de la versión corregida. Pasados los 20 días, el editor, a discreción, tratará el manuscrito como caducado, por lo que deberá ser presentado nuevamente siguiendo el proceso indicado.

TIPOS DE ARTÍCULOS

Artículos de investigación científica. Documento que presenta, de manera detallada, los resultados originales de investigaciones culminadas y está constituido por: 1. INTRODUCCIÓN, 2. MÉTODO, 3. RESULTADOS, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS. Los agradecimientos son opcionales y se incluyen luego de las conclusiones.

Artículo de reporte de caso. Documento que presenta los resultados de un estudio sobre una situación particular con el fin de dar a conocer las experiencias técnicas y metodológicas consideradas en un caso específico. Incluye una revisión sistemática comentada de la literatura sobre casos análogos y está constituido por: 1. INTRODUCCIÓN, 2. MÉTODO, 3. RESULTADOS, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS. Los agradecimientos son opcionales y se incluyen luego de las conclusiones.

Artículos de reflexión. Documento que presenta resultados de investigación sobre un tema específico bajo una óptica analítica, interpretativa y crítica del(los) autor(es) con base en fuentes originales (por lo menos 30 referencias). La estructura es: 1. RESUMEN, 2. INTRODUCCIÓN, 3. DESARROLLO DEL TEMA, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Artículo de revisión (Review). Documento resultado de una revisión analítica y crítica de literatura (mínimo 50 referencias) sobre un campo en ciencia o tecnología en el que se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones publicadas para mostrar los avances científicos y las tendencias de desarrollo, más los aportes de los proponentes. Está compuesto por: 1. RESUMEN, 2. INTRODUCCIÓN, 3. DESARROLLO DEL TEMA, 4. CONCLUSIONES y 5. REFERENCIAS.

Cartas al editor. Son comunicaciones cortas, con posiciones críticas, analíticas o interpretativas sobre los manuscritos publicados previamente en la revista, temas o asuntos de interés profesional para los lectores, que a juicio del Comité editorial constituyen un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia.

Editorial. Documento escrito por el editor, un miembro del comité editorial o un investigador invitado sobre orientaciones en el dominio temático de la revista, sobre aportes a los investigadores en cuestiones de presentación y estructura de sus artículos, con reflexiones sobre la presentación de documentos escritos, su normatividad, su importancia y otros.

✦ FORMA Y PREPARACIÓN DE MANUSCRITOS

Todo documento remitido a **BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL** debe cumplir con:

- Originalidad: el aporte debe ser totalmente inédito, no publicado en ningún otro medio.
- Consistencia metodológica: en donde se haga evidente el uso de métodos y técnicas de investigación válidos.
- Significación del asunto tal que informe o ilustre situación relevante en el sector Agropecuario y Agroindustrial.
- Impacto para un amplio sector de la academia, la investigación y estudiantes.
- Avance del campo: en el cual sea claro y evidente el aporte a consideraciones y prácticas de mejora en el campo de investigación Agropecuario y Agroindustrial.
- Consideraciones éticas.
- Estilo de redacción claro, conciso y ordenado, evitando jergas personales y expresiones locales.

Partes del manuscrito

La **INTRODUCCIÓN** debe resaltar la importancia de la investigación, presentar la literatura relacionada y entregar antecedentes necesarios para comprender la hipótesis de los autores, terminando con un párrafo que indique claramente los objetivos de la investigación.

El **MÉTODO** debe tener suficiente información que permita a otro investigador replicar el ensayo y lograr los mismos resultados, así como la inclusión del diseño experimental, el análisis estadístico y las referencias de los métodos ya publicados.

Los **RESULTADOS** se deben presentar en forma clara, apoyados con cuadros y figuras, con el análisis estadístico y de los alcances de otros investigadores que alimenten la discusión.

Las **CONCLUSIONES** se describen de forma clara y precisa, derivadas del análisis de los resultados y con base en los objetivos planteados.

Los **AGRADECIMIENTOS** se incluyen si el autor(es) lo desea (n), redactados en forma sobria y que no supere 4 líneas.

Las **REFERENCIAS** deben contener todos los documentos consultados.

Formato general. La extensión máxima es de 12 páginas, en tamaño carta (21,59 cm de ancho y 27,94 cm de alto) con interlineado sencillo y contenido a doble columna (7,5 cm de ancho de columna) a partir de la INTRODUCCIÓN, escrito en Arial recta (excepto los nombres científicos que van en cursiva) de 11 puntos, márgenes de 3 cm en el borde superior, 2 cm en el inferior y 2,5 cm en las márgenes laterales. Las cifras decimales se separan con coma y los nombres científicos se escriben en cursiva. Cuando se usen siglas, debe indicarse el significado completo la primera vez, luego puede usarse la sigla como tal.

Título del manuscrito. Debe estar en los tres idiomas y hacer referencia al contenido de una forma clara y concisa, escrito en Arial recta 11 puntos (excepto los nombres científicos), mayúscula, negrilla y centrado y no debe exceder 15 palabras: si ello no es posible, deberá incluir un subtítulo luego de dos puntos.

Información del autor (es). Los autores se nombran según la importancia y contribución en la investigación o en la preparación del manuscrito, separados entre sí por comas y enumerados con superíndice. Posterior a los títulos, a dos interlíneas, centrado, en mayúscula y sin negrilla, incluir primer y segundo nombre si lo tiene, primer y segundo apellido separados por un guión medio. En nota al pie de página (Arial 8 puntos, en la parte inferior de la primera página y justificada) se indicará la filiación de cada autor, finalmente la palabra **Correspondencia** (en negrilla) y dos puntos, en la que debe aparecer el correo institucional del autor elegido para el envío de correspondencia.

Ejemplo:

¹Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA).
Máximo título profesional alcanzado. Ciudad, País.

Correspondencia: gfvssp@unicauca.edu.co

Resumen. La palabra RESUMEN debe justificarse al margen izquierdo, en mayúscula y negrilla, iniciando la escritura luego de dos interlíneas en un solo párrafo justificado sin exceder de 200 palabras e incluirá Introducción, justificación, objetivos, metodología, resultados y conclusiones de la investigación haciendo énfasis en los logros alcanzados. Debe ser conciso, escrito en español, inglés (**ABSTRACT**) y portugués (**RESUMO**).

Palabras clave. Se ubican luego de cada resumen. El título en mayúscula, negrilla, en español (**PALABRAS CLAVE**), inglés (**KEYWORDS**) y portugués (**PALAVRAS-CHAVE**) seguido de dos puntos. Se admiten, mínimo tres (3) y máximo cinco (5) palabras clave que no hagan parte del título, con la primera letra en mayúscula, separadas entre sí por coma y con punto al final.

Ejemplo:

PALABRAS CLAVE: Reología, Pos cosecha, Maduración, *Bactris gasipaes*.

Cuadros y figuras. Se acepta un máximo de 6 figuras y/o cuadros y deberán aparecer dentro del texto y procesarse en el formato original, con buen contraste y resolución (calidad mínima de 300 dpi) para evitar policromías y facilitar la diagramación. El título va en la parte superior y no debe superar dos líneas, en Arial recta normal 9, separado por una interlinea y con punto final; debe incluir la palabra Cuadro o Figura seguido del número arábigo consecutivo (en negrilla), un punto y una breve descripción (Ejemplo: **Cuadro 1.** Título descriptivo). Se deben usar líneas horizontales y verticales para separar las entradas del cuadro y cada columna debe tener encabezado (en negrilla, con mayúscula inicial). El tamaño de fuente al interior de un cuadro es arial 9 puntos normal y, en el caso de necesitarse algún pie de cuadro/figura o fuente de consulta, debe estar escrito en Arial 8 puntos normal.

Títulos (en arial recta 11 puntos). Los de primer nivel (partes principales del manuscrito) con mayúscula sostenida y negrilla; los de segundo nivel con mayúscula inicial, negrilla y sin punto final, separados del texto por dos interlíneas. Los de tercer nivel con mayúscula inicial, negrilla y un punto seguido, continuando el texto en el mismo renglón luego de un espacio.

Ejemplo:

MÉTODO

Materiales

Material vegetal. El material vegetal usado.....

Expresiones matemáticas. Deben ser escritas dejando dos espacios sobre, debajo y entre cada una de ellas y se debe utilizar el editor de ecuaciones de MS Word. Deben seguir un formato uniforme, justificarse al margen izquierdo y usar la expresión (Ec.1) con números arábigos consecutivos justificada al margen derecho (para mayor facilidad, insertarlas en un cuadro de dos columnas, sin bordes), citándolas en el sitio indicado. El significado de las variables y sus respectivas unidades deben aparecer luego de que se utilicen por primera vez, usando el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Referencias. Deben ser al menos 20 y mínimo el 70% de ellas deben ser recientes (de los últimos tres años) y corresponder a artículos de investigación científica (al menos el 60% del total) de corriente principal que puedan respaldar lo escrito, minimizando el uso de literatura gris (tesis, de informes locales y de poco alcance, y de trabajos de congresos, a menos que sea necesario). Dentro del manuscrito se deben indicar según el orden de aparición y encerradas entre corchetes [1,2], notación que se mantendrá en la sección de **REFERENCIAS**. Se permitirá máximo un 15% de autocitación y se espera que gran parte de las citas provengan del idioma inglés. Si la referencia cuenta con 4 o más autores, usar *et al.*

Para las referencias se deben seguir estos criterios:

Artículo científico:

SMITH, J.S., SORIA-WHITE, R. and WEBBER, A. Chaos in a model of forced quasi-geostrophic flow over topography: an application of Melnikov's method. *Food Control*, 2(3), 1991, p. 511-547, DOI (si lo tiene).

Libro:

BILLAS, G.L. y GOSPS, J. Física cuántica. 4 ed. Madrid (España): Acribia, 1990, 450 p.

Capítulo de libro:

LEWIS, P. and STEVENS, J.G. En: Time Series Prediction. Modeling time series by using Multivariate Adaptive Regression Splines (MARS). 1 ed. Madrid (España): Iberoamericana, 1994, p. 297-318.

Memoria de evento:

ÁLZATE, N., BOTERO, T. y CORREA, D. El arte de la escritura de artículos. Memorias XIX Congreso Latinoamericano de Ponencias Científicas. Córdoba (Argentina): Instituto Argentino de Investigaciones, Tomo II, 2000, p. 219-228.

Normas técnicas:

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). ASTM D1434-82: Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. Pennsylvania (USA): 2009, 13 p.

Reporte de un organismo o Gobierno:

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. La situación de la provisión de alimentos en un mundo moderno. Bogotá (Colombia): 1997, 57 p.

Tesis:

JACOBS J. Regulación of life history strategies within individuals in predictable and unpredictable environments [Ph.D. Thesis Social Communication]. Seattle (United States): University of Washington, Faculty of Humanities, 1996, 345 p.

Patentes:

MOREIRA, G. e MATOS, T. Embalagem biodegradável de amido de inhame. US 6.444.567, Clases 343, 356. Sao Paulo (Brasil): 2001.

Monografías electrónicas:

MACIAS, J.C., SANTOS, J.M. and WILD, E. Handbook of Nanomaterials [online]. 1996. Disponible: <http://nano.hb/handbook/kewat.com/> [citado 4 de abril de 2004].

Otras referencias electrónicas:

NOAA-CIRES. Climate Diagnostics Center. Advancing Understanding and Predictions of Climate Variability [online]. 2010. Disponible: <http://www.cdc.noaa.gov> [citado 8 de Agosto de 1998].

ASHWELL, M. ILSI Europe Concise Series. Concepts of functional foods [online]. 2002. Disponible: http://www.ilsi.org/Europe/Publications/C2002Con_Food.pdf. [citado 13 mayo de 2009].

EDITORIAL

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

- 16 **Análisis multimodelo del crecimiento de *Pseudoplatystoma orinocoense* en la cuenca media del Orinoco, Venezuela**
Ángel González, Jeremy Mendoza, Freddy Arocha, Arístide Marquez
- 25 **Efecto entre microorganismos eficientes y fitomas-e en el incremento agroproductivo del frijol**
Alexander Calero-Hurtado, Elieni Quintero-Rodríguez, Anery Pérez-Díaz, Dilier Olivera-Viciedo, Kolima Peña-Calzada, Janet Jiménez-Hernández
- 34 **Efecto de la temperatura y velocidad del aire sobre la humedad final de tomillo (*Thymus vulgaris*)**
Carlos Osvaldo Velásquez-Santos, Julián Alberto Uribe-Gómez
- 45 **Frecuencia de corte de pasto elefante morado *Pennisetum purpureum* Schumach**
Nelson José Vivas-Quila, Milvia Zuleida Criollo-Dorado, María Camila Cedeño-Gómez
- 56 **Análisis de genotoxicidad por presencia de arsénico en el suelo: prueba de micronucleos en extractos de *Tradescantia* clone 4430 (trad-mcn)**
Miguel Ángel Rico Rodríguez, Francisco Prieto-García, Elena María Otazo-Sánchez, Judith Prieto Méndez, Otilio Arturo Acevedo-Sandoval
- 64 **Hidrólisis enzimática en harina de quinua y tarwi por efecto de α -amilasa**
Nancy Alejandra Navia-Coarite, Gaston Luis Nina-Mollisaca, Evelin Paty Mena-Gallardo & Lily Salcedo-Ortiz

- 74 **Caracterización fenotípica y molecular de *Fusarium spp.* proveniente de la zona de producción de ajonjolí en Venezuela**
Gilberto Alvarado, Hernán Laurentin, Pastora Querales,
Dilcia Ulacio, Ana Gómez, Nalleth Méndez

ARTÍCULO CORTO

- 82 **Detección molecular de depredación de *Hypothenemus hampei* (coleoptera: curculionidae) por *Wasmannia auropunctata* (hymenoptera: formicidae)**
Elisabeth Jiménez-Carmona, Inge Ambrecht, Rodrigo Quintero,
James Montoya-Lerma, Luis Miguel Constantino

Reconocimiento a un amigo y su pupilo.

Hace casi 15 años, el profesor de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, Magister JORGE ELIECER CARRERA CATAÑO, creó la revista denominada BIOTECNOLOGIA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL, con la ayuda y patrocinio de varios profesores de la Facultad; en esos albores de esas primeras ediciones, empezaron a forjar su carácter algunos estudiantes creativos y curiosos que le aportaban al profesor Carrera su trabajo y exiguo conocimiento sin esperar nada a cambio; solo les motivaba lo que pudieran aprender al lado de su notable maestro.

Tristemente y en la flor de la vida, nuestro querido amigo partió con rumbo seguro, buscando a Dios y dejándolo el legado a su pupilo favorito, el cual descubre cada día en su laboratorio los secretos de la biotecnología y ha podido llevar en alto la inmensa responsabilidad que le dejó su tutor.

Las revista ha plasmado este registro de nuevos conocimientos en docenas de investigaciones del profesor JOSE LUIS HOYOS CONCHA y es así como se puede decir que la herencia que dejó el profesor a este estudiante de otrora, dio un excelso fruto ya que este Joven Ingeniero Agroindustrial y Doctor en Ingeniería con énfasis en alimentos, a quien tuve el gusto de ser su profesor, también es hoy en día uno de los bastiones en investigación y desarrollo de un vasto sector del Departamento del Cauca; su fuerte ha sido como era de esperarse, la biotecnología y su enfoque hasta este año, la transformación de subproductos de la trucha, en concentrado para peces, entre otros.

Este profesor, con sus investigaciones y talentos, ha desarrollado una planta de transformación de alimento para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en las comunidades indígenas del Municipio de Silvia del Departamento del Cauca, ayudando de esta manera a cientos de familias productoras de este deprimido sector.

Esta moderna planta fue diseñada y construida en su totalidad gracias al ánimo y vocación de servicio a la sociedad del profesor JOSE LUIS HOYOS CONCHA, quien se encuentra perfilando sus conocimientos para ayudar al sector campesino que trabaja con la siembra y transformación de la fresa; dichas investigaciones, podemos asegurar, conducirán a nuevos logros y meritorias investigaciones sobre este producto donde los campesinos con sus manos y azadones luchan por llevar el sustento diario a sus hogares. Estos campesinos, de la mano de la biotecnología, estudiantes, maestros y Universidad, serán el motor del desarrollo de la fresa en el Departamento del Cauca.

Quisiera exaltar en esta editorial, la formación docente que se ha logrado a través de los proyectos que lidera el profesor mencionado; me pregunto, cuántos doctores, magister, especialistas y monitores ha logrado motivar y financiar a través de su trabajo y liderazgo?, Sobrepasan tal vez la veintena de jóvenes ingenieros que hoy son una nueva luz y esperanza de la aplicación de nuevas tecnologías a partir de los conocimientos en biotecnología.

Me ha parecido justo resaltar la labor de este docente en este encabezado de la editorial; este sencillo reconocimiento es uno de muchos que ha recibido y está por recibir nuestro apreciado estudiante y desde hace varios años, amigo y compañero de trabajo de la Facultad de Ciencias Agrarias de nuestra querida Universidad del Cauca; donde un lejano día tuvo la fortuna de cruzarse en su camino con un hombre noble que es una leyenda notable en nuestra facultad y que lleva el nombre de nuestro laboratorio de biotecnología y de la biblioteca de la facultad, hombre del que su familia y nosotros tuvimos el gusto de conocer y tenerlo cerca, hombre que fue todo un ejemplo para la sociedad y que gracias a él estamos leyendo y escribiendo en esta prestigiosa revista.

En esta edición de la revista se muestran los resultados de una investigación liderada por Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca sobre la "FRECUENCIA DE CORTE DE PASTO ELEFANTE MORADO *Pennisetum purpureum* Schumach", en cabeza del profesor Ph.D. NELSON JOSÉ VIVAS QUILÁ con el objetivo de definir condiciones de manejo de forrajes de corte para el trópico y verificar la capacidad de recuperación de elefante morado (*Pennisetum purpureum*), evaluando diferentes edades de rebrote las variables vigor, altura de planta, producción de forraje verde, porcentaje de materia seca e incidencia de plagas y enfermedades, considerando variables como la calidad nutricional, análisis de costos y la curva de crecimiento.

Se cuenta con un ANÁLISIS MULTIMODELO DEL CRECIMIENTO DE *Pseudoplatystoma orinocoense* EN LA CUENCA MEDIA DEL ORINOCO, VENEZUELA donde se analiza el crecimiento de este tipo de bagre, sobre todo porque había cierta incertidumbre sobre si estudios anteriores tenían razón sobre la ocurrencia de sobre explotación en la pesca artesanal en el río Orinoco, importante arteria fluvial de este hermano país.

Se tiene un importante análisis sobre depredadores naturales denominado DETECCIÓN MOLECULAR DE DEPREDACIÓN DE *Hypothenemus hampei* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) POR *Wasmannia auropunctata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), donde el depredador es un tipo de hormiga y la presa es la broca del café para evaluar la interacción, depredador -presa a través del análisis molecular que aporta conocimientos frescos a la ciencia que puede tener repercusiones económicas notables a nivel mundial, motivando la continuidad de investigaciones en tan importante relación biológica.

Se encuentra presente también en esta edición el estudio sobre HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN HARINA DE QUINUA Y TARWI POR EFECTO DE α -AMILASA d que evaluó la digestibilidad de polisacáridos contenidos en harina de

quinua real (*Chenopodium quinoa* Willd), variedad blanca (QB), negra (QN) y en oligosacáridos contenidos en harina de tarwi (*Lupinus mutabilis*) (T) por aplicación enzimática de α -amilasa *in vitro*, encontrando importantes resultados.

El estudio denominado ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD POR PRESENCIA DE ARSÉNICO EN EL SUELO: PRUEBA DE MICRONUCLEOS EN EXTRACTOS DE *Tradescantia* CLONE 4430 (TRAD-MCN) analiza diferentes parámetros relacionados con la genotoxicidad de suelos con arsénico encontrando diferencias significativas a partir de diferencias significativas y correspondencias lineales analizando diferentes grupos de control.

La investigación denominada EFECTO DE LA TEMPERATURA Y VELOCIDAD DEL AIRE SOBRE LA HUMEDAD FINAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris*) muestra los resultados para el proceso de secado del tomillo, cuyo objetivo principal es establecer la incidencia de la temperatura y velocidad del aire sobre el contenido de humedad final.

Por último, el estudio sobre el EFECTO ENTRE MICROORGANISMOS EFICIENTES Y FITOMAS-E EN EL INCREMENTO AGROPRODUCTIVO DEL FRIJOL que demuestra que puede ser una alternativa para cambiar el metabolismo de las plantas y, en consecuencia, mejorar el rendimiento del cultivo de frijol.

Así pues, estimados lectores, me permito presentar el volumen 17 número 1 de 2019 de la revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial; edición llena de conocimientos frescos, aportes y contribuciones científicas que nos llevan a conocer un poco más del mundo en que vivimos y de los investigadores que a través de sus conocimientos comparten con nuestros lectores.

Cordialmente,

MG. JUAN MIGUEL VILLA LATORRE¹

1 Ingeniero Industrial, Profesor Titular, UNIVERSIDAD DEL CAUCA.

Análisis multimodelo del crecimiento de *Pseudoplatystoma orinocoense* en la cuenca media del Orinoco, Venezuela

Multimodal analysis of the growth of *Pseudoplatystoma orinocoense* in the middle basin of the Orinoco, Venezuela

Análise múltipla do crescimento do *pseudoplatystoma orinocoense* na bacia média do Orinoco, Venezuela

ÁNGEL GONZÁLEZ¹, JEREMY MENDOZA², FREDDY AROCHA³, ARÍSTIDE MARQUEZ⁴

RESUMEN

Entre las especies de mayor importancia comercial y pesquera de la pesca artesanal del río Orinoco se encuentra Pseudoplatystoma orinocoense, donde el desembarco de peces pequeños motivó la realización de estudios anteriores de evaluación de su

Recibido para evaluación: 16 de Julio de 2018.

Aprobado para publicación: 13 de Noviembre de 2018.

- 1 Instituto Limnológico, Universidad de Oriente, Departamento de Recursos Acuáticos, Dinámica Poblacional de Peces Continentales. MsC Biología Pesquera. Cumaná, Venezuela.
- 2 Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Departamento de Biología Pesquera, Dinámica Poblacional de Peces Marinos. Doctor Biología Pesquera. Cumaná, Venezuela.
- 3 Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Departamento de Biología Pesquera, Biología Pesquera. Doctor Biología Pesquera. Cumaná, Venezuela.
- 4 Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Oceanografía Química. Doctor Oceanografía Química. Cumaná, Venezuela.

Correspondencia: angelgonzalez78@hotmail.com

población, que demostraron un nivel de sobreexplotación del recurso. Sin embargo, los valores de los parámetros de crecimiento que se usaron en su evaluación han creado cierta incertidumbre por estimarse al aplicar a priori el modelo tradicional de von Bertalanffy, por lo que hubo la necesidad de verificar dichos resultados, utilizando la inferencia de modelos múltiples de crecimiento y el criterio de la información de Akaike (AIC) para seleccionar el modelo de mejor ajuste. Los modelos usados fueron las fórmulas unificadas von Bertalanffy (U-von Bertalanffy), Logístico (U-Logístico) y Gompertz (U-Gompertz), derivados del modelo genérico U-Richardas, cuyos ajustes dependieron de la información contenida en los datos. Cuando los datos incluyeron todas las edades el modelo U-von Bertalanffy produjo el mejor ajuste, coincidiendo con resultados anteriores de crecimiento de la especie. Al excluir las edades de uno y dos años, como ocurre con los datos provenientes de la pesca artesanal debido a la selectividad, el mejor ajuste lo produjeron los modelos U-Logístico y U-Gompertz.

ABSTRACT

Among the species of greater commercial and fishing importance of the artisanal fishery of the Orinoco River is Pseudoplatystoma orinocoense, where the disembarkation of small fish motivated the realization of previous studies of evaluation of its population, which demonstrated a level of overexploitation of the resource. However, the values of the growth parameters that were used in their evaluation have created some uncertainty to be estimated when applying the traditional von Bertalanffy model a priori, so there was a need to verify these results, using the inference of multiple models of Growth and Akaike Information Criteria (AIC) to select the best fit model. The models used were the unified formulas von Bertalanffy (U-von Bertalanffy), Logistic (U-Logistic) and Gompertz (U-Gompertz), derived from the generic model U-Richardas, whose adjustments depended on the information contained in the data. When the data included all ages, the U-von Bertalanffy model produced the best fit, coinciding with previous results of growth of the species. By excluding the ages of one and two years, as occurs with data from artisanal fishing due to selectivity, the best fit was produced by the U-Logistic and U-Gompertz. models.

RESUMO

Entre as espécies de maior importância comercial e pesqueira da pesca artesanal do rio Orinoco está o Pseudoplatystoma orinocoense, onde o desembarque de peixes pequenos motivou a realização de estudos prévios de avaliação de sua população, o que demonstrou um nível de superexploração do recurso. No entanto, os valores dos parâmetros de crescimento que foram usados em sua avaliação criaram alguma incerteza a ser estimada ao aplicar o modelo tradicional de von Bertalanffy a priori, portanto, houve uma necessidade de verificar esses resultados, usando a inferência de múltiplos modelos de Crescimento e Akaike Information Criteria (AIC) para selecionar o melhor modelo de ajuste. Os modelos utilizados foram as fórmulas unificadas von Bertalanffy (U-von Bertalanffy), Logística (U-Logistic) e Gompertz (U-Gompertz), derivadas do modelo genérico U-Richardas, cujos ajustes dependeram das infor-

PALABRAS CLAVE:

Bagres Pimelodidae, Dinámica Poblacional, Parámetros de Crecimiento, Pesquería artesanal

KEYWORDS:

Pimelodidae catfish, Population Dynamics, Growth Parameters, Artisanal fisher

PALAVRAS-CHAVE:

Peixe-gato Pimelodidae, Dinâmica Populacional, Parâmetros de Crescimento, Pesca Artesanal.

mações contidas nos dados. Quando os dados incluíram todas as idades, o modelo de U-von Bertalanffy produziu o melhor ajuste, coincidindo com resultados anteriores de crescimento da espécie. Ao excluir as idades de um e dois anos, como ocorre com os dados da pesca artesanal devido à seletividade, o melhor ajuste foi produzido pelos modelos U-Logistic e U-Gompertz.

INTRODUCCIÓN

Pseudoplatystoma orinocoense es un bagre dulceacuícola perteneciente a la familia Pimelodidae, endémica de la cuenca del río Orinoco [1]. En el río Orinoco se encuentra entre las especies más importantes desde el punto de vista pesquero y comercial junto con la especie *Pseudoplatystoma metaense* [1]. *P. orinocoense* es conocida comúnmente como rayao en Venezuela y Colombia.

En la pesca continental de Venezuela, *P. orinocoense* y *P. metaense* conforman conjuntamente 15,7% de la captura total desembarcada, con un promedio en la producción de 6121 ton/año entre 1996 y 2003 [2]. Particularmente en la región media del Orinoco se encuentran entre las más importantes en los desembarcos de la pesca artesanal, principalmente, *P. orinocoense*, con un 12,0% en la composición de las capturas, y unaproducción entre 8,8 y 23,1 ton/año, dependiendo del nivel del río [3,4].

En los desembarcos de los últimos años ha prevalecido la captura de tamaños relativamente pequeños de *P. orinocoense* debido a la selectividad del arte que generalmente se utiliza [5], que hace necesaria una evaluación de la población, donde la determinación de la edad y el crecimiento es una información básica [6].

En la región del Orinoco medio se determinó el crecimiento de *P. orinocoense* (sinónimo *P. fasciatum*) [7] a partir de datos retro-calculados a la formación de los anillos de crecimiento en la espina dorsal [8-11], quedando la incertidumbre en cuanto a los estimados de los parámetros de crecimiento, así como en los resultados de la evaluación de la población que demostró una sobrepesca del recurso [12], por haberse utilizado a *priori* el modelo de von Bertalanffy.

Hasta la fecha, los estudios publicados sobre el crecimiento de *P. orinocoense* y especies relacionadas se han realizado en base a la elección arbitraria del modelo de von Bertalanffy. Como los realizados en el río

Apure en Venezuela con las especies *P. orinocoense* y *P. metaense* [13], en el río Cuibá de Brasil con la especie *P. reticulatum* [14] y en la Amazonia boliviana con *P. punctifer* y *P. metaense* [15]. Igualmente, los realizados en las especies *P. metaense* del río apure [2] y *Pseudoplatystoma corruscans* del río Cuiabá [16], y en otras especies [17-19]. La selección a *priori* del modelo de von Bertalanffy para el estudio del crecimiento no tiene en cuenta incertidumbres relacionadas con la estructura del modelo, y supone implícitamente la existencia de un modelo “verdadero”, una suposición considerada poco realista y no justificada desde el punto de vista filosófico y matemático [20].

En este sentido, se ha demostrado que el uso de la inferencia de modelos múltiples es una mejor alternativa en comparación con el uso a *priori* del modelo de von Bertalanffy [21], un enfoque adoptado actualmente por muchos autores [20,22-24], y considerado en el presente trabajo para determinar los parámetros de crecimiento de *P. orinocoense*.

En el trabajo se usaron tres grupos de datos que incluyeron los de longitud-edad observados según el número de anillos de crecimiento en la espina dorsal de *P. orinocoense* [7], el total de datos retro-calculados para todas las edades, y un subconjunto de datos retro-calculados que excluyeron a peces de uno y dos años de edad [7]; estos dos últimos grupos de datos fueron ajustados anteriormente seleccionando a *priori* el modelo de von Bertalanffy [7], que es precisamente el objetivo del presente trabajo, verificar o no el ajuste de estos datos a dicho modelo, usando además otros modelos de crecimiento para seleccionar realmente el de mejor ajuste.

La gestión efectiva de la pesca de *P. orinocoense* requiere del estudio detallado de su dinámica poblacional que incluye la estimación precisa de los parámetros de crecimiento [6], donde el uso de la inferencia de modelos múltiples constituye una mejor alternativa en comparación con la selección a *priori* del modelo de von Bertalanffy, como se venía haciendo hasta ahora [21].

En el uso de modelos múltiples para el estudio del crecimiento, los modelos de von Bertalanffy, Logístico y Gompertz generalmente han sido utilizados en sus formas tradicionales [20,22,24,29,30], con el inconveniente que presentan al manifestar diferentes interpretaciones de los parámetros de crecimiento [25,26], que limitan la estimación de un modelo promedio cuando

el valor del peso ponderado de Akaike (W_i) así lo requiera [24]. Otra desventaja de la forma tradicional de dichos modelos es que no estiman otros parámetros de crecimiento considerados importantes, como el valor inicial de la curva W_0 . De allí que una mejor alternativa ante los modelos tradicionales es el uso de los modelos unificados de la familia U-Richards [25,26].

MÉTODO

A los datos de longitud-edad de *P. orinocoense* [7] se les realizó un ajuste no lineal, con ayuda del statgraphic 1.4, a tres modelos de crecimiento que incluyeron los modelos unificados U-von Bertalanffy, U-Logístico y U-Gompertz, derivados del modelo global U-Richards, según las siguientes ecuaciones:

$$L(t) = L_{\infty}(1 + (d - 1)) * \exp\left(\frac{-K(t - T_i)}{d^{(1-d)}}\right)^{\frac{1}{1-d}} \quad (\text{Ec.1})$$

$$L(t) = L_{\infty} \left(1 + \left(\left(\frac{W_0}{L_{\infty}} \right)^{(1-d)} - 1 \right) * \exp\left(\frac{-Kt}{d^{(1-d)}}\right) \right)^{\frac{1}{1-d}} \quad (\text{Ec.2})$$

Las versiones unificadas de los modelos U-von Bertalanffy y U-Logístico se alcanzaron sustituyendo al parámetro d de las ecuaciones 1 y 2 por las constantes $d = 2/3$ y $d = 2$ respectivamente [25]. En el caso del modelo U-Gompertz, d se calculó como un límite y no dándole un determinado valor [26], según las siguientes ecuaciones:

$$L(t) = L_{\infty} * \exp\left(-\exp(-e * K(t - T_i))\right) \quad (\text{Ec.3})$$

$$L(t) = L_{\infty} \left(\frac{L_{\infty}}{W_0} \right)^{\exp(-e * Kt)} \quad (\text{Ec.4})$$

En las ecuaciones 1, 2, 3 y 4, $L_{(t)}$ = longitud teórica; L_{∞} = longitud asintótica; t = edad; K = máxima tasa de crecimiento relativo en la inflexión de la curva; T_i = edad en la inflexión de la curva; d = exponente o parte del

mismo que controla el valor en la inflexión; W_0 = valor inicial de la curva ($t = 0$); e = número neperiano.

La clasificación y comparación de los modelos para seleccionar el de mejor ajuste se hizo utilizando el criterio de la información de Akaike (AIC) para muestras pequeñas (AICc) [20,22,26,27], según las siguientes ecuaciones:

$$AIC_c = n * \log(\sigma^2) + 2k + \frac{2k + (k + 1)}{n - k - 1} \quad (\text{Ec.5})$$

$$\Delta AIC_c = AIC_c - AIC_{min} \quad (\text{Ec.6})$$

donde, ; RSS suma de cuadrado residual de cada modelo, n el tamaño de la muestra, k el número total de parámetros de regresión estimados en cada modelo (incluyendo a σ^2), AIC_c el AIC de cada modelo, AIC_{min} el valor más pequeño del AIC_c y ΔAIC_c el grado de separación de cada AIC_c con relación al AIC_{min} . AIC_c utiliza la función original que define el criterio de la información de Akaike (AIC), más un término adicional de corrección de sesgo que se usa generalmente cuando la relación es pequeña (< 40) [22].

El modelo más parsimonioso o preciso en el ajuste de los datos fue el que presentó el valor mínimo del AIC (AIC_{min}), considerando que mientras mayor sea la diferencia entre el AICc de cada modelo candidato con relación al AIC_{min} (ΔAIC_c), es menos probable que el modelo produzca un buen ajuste. En este sentido, se tiene como regla general que los modelos donde el ΔAIC_c es menor que dos ($\Delta AIC_c < 2$), tendrán un apoyo sustancial de los datos y deben ser considerados al hacer las inferencias, además de indicar una correspondencia con el modelo más preciso (AIC_{min}). Cuando los modelos alcanzan un ΔAIC_c entre 4 y 7 ($4 \leq \Delta AIC_c \leq 7$) tendrán medianamente menos soporte de los datos. Cuando $\Delta AIC_c > 10$ esencialmente no tendrán soporte alguno, o no explican una variación sustancial en los datos [20,28,29].

Para tener una mayor certeza en cuanto a la selección del mejor modelo, se calculó la plausibilidad de cada uno utilizando la ponderación de Akaike (W_i), según la siguiente ecuación:

$$W_i = \frac{e^{(-\frac{1}{2} * \Delta i)}}{\sum e^{(-\frac{1}{2} * \Delta i)}} \quad (\text{Ec.7})$$

donde, Δ_i fue el ΔAIC_c de cada modelo. De acuerdo al valor de W_i se consideró como el modelo más plausible o de mejor ajuste, aquel con valor mayor a 0,9 ($W_i > 90\%$). Cuando los valores de W_i son menores a 0,9 ($W_i < 90\%$), se supuso que ningún modelo fue superior a otro y se determinó un modelo promedio [20,29].

En el modelo promedio, la media del parámetro X (se calculó usando la ecuación:

$$X_{prom} = \sum W_i * X_i \quad (Ec.8)$$

mientras que el error estándar se estimó mediante la ecuación:

$$E.S.X_{prom} = \sum W_i * (VarX_i + (X_i - X_{prom})^2)^{\frac{1}{2}} \quad (Ec.9)$$

donde $E.S.X_{prom}$ es el error estándar del parámetro X , y la varianza del parámetro X , estimada del ajuste de los datos con cada modelo i [20].

RESULTADOS

Ante el inconveniente de los modelos tradicionales de von Bertalanffy, Logístico y Gompertz para la comparación de parámetros de crecimiento, el uso de los modelos unificados U-von Bertalanffy, U-Logístico y U-Gompertz, derivados del modelo genérico U-Richards, garantizan la selección de modelos que estiman valores realistas de dichos parámetros, además de una consistente interpretación y comparación [25,26].

Utilizando los datos observados de longitud-edad según el número de anillos en cortes de la espina dorsal de *P. orinocoense* [7], el ajuste no lineal de los modelos candidatos produjo estimaciones de los parámetros de crecimiento y estadísticos (RSS y R^2) representados en el Cuadro 1.

Los valores relativamente altos del R^2 , estimados para los modelos U-Logístico y U-Gompertz, en comparación con el estimado para el modelo U-von Bertalanffy (Cuadro 1), únicamente indicaron una mayor explicación de la variación de los datos y no de por sí un mejor ajuste, como se ha interpretado comúnmente [25,26,27]; en

este sentido, fue más exacto y confiable el uso del criterio de información de Akaike (AIC) para seleccionar el modelo de mejor ajuste [20,22,23,24].

El AIC es un método reciente de selección de modelos matemáticos que utiliza la información *Kullback-Leibler* (distancia $K-L$) como medida conceptual de la distancia relativa de un modelo dado con relación al que en realidad describe la información contenida en los datos [29]. En este sentido, el modelo U-Gompertz fue el más preciso en el ajuste de los datos por presentar el valor mínimo del AIC (AIC_{min}); en correspondencia, además, con el modelo U-Logístico según el valor del ΔAIC_c ($\Delta AIC_c < 2$; Cuadro 2). El modelo U-von Bertalanffy no ajustó sustancialmente los datos por presentar un valor del ΔAIC_c mayor que 10 ($\Delta AIC_c > 10$), y una nula plausibilidad en el ajuste de los datos, de acuerdo al valor de W_i ($W_i = 0$; Cuadro 2).

Según el AIC_{min} y el valor del W_i , el modelo que produjo un mejor ajuste fue el U-Gompertz ($W_i = 71,7\%$; Cuadro 2), pero sin una clara superioridad sobre el modelo U-Logístico ($W_i < 90\%$), por lo que se procedió a la estimación de un modelo promedio cuyos cálculos para el L_{∞} se encuentran representados en el Cuadro 3.

Los valores de los parámetros K , T_i y W_0 correspondientes al modelo promedio, estimados siguiendo el mismo procedimiento usado para L_{∞} , están representados en

Cuadro 1. Parámetros y estadísticos de los modelos U-von Bertalanffy, U- Logístico y U-Gompertz.

Modelo	L_{∞}	K	T	W_0	RSS	R^2
ECVB	81,2	0,386	67,9	1,4	148333	0
Logístico	73,0	0,554	4,5	21,0	387	96
Gompertz	80,1	0,067	3,1	13,5	373	96

ECVB = Modelo U-von Bertalanffy.

Cuadro 2. Criterio de información de Akaike (AIC) y peso ponderado de Akaike (W_i) en los modelos U-von Bertalanffy, U-Logístico y U-Gompertz.

Modelo	AIC_c	ΔAIC_c	W_i	W_i (%)
ECVB	357,9	291,201	0	0
Logístico	68,546	1,858	0,283	28,3
Gompertz	66,688 ¹	0	0,717	71,7

ECVB = Modelo U-von Bertalanffy; 66,688¹ = A/Cc_{min} .

el Cuadro 4, con una curva de crecimiento en longitud de forma sigmoidea, representada en la Figura 1.

Los parámetros de crecimiento y estadísticos (RSS y R^2) estimados por los modelos candidatos ajustados a los datos retro-calculados para todas las edades (datos totales), y los retro-calculados que excluyen a las edades uno y dos (subconjunto), están representados en el Cuadro 5.

El ajuste no lineal de los modelos candidatos al total de datos retro-calculados demostró que el modelo U-Logístico no explicó variación alguna de los datos de longitud-edad según el R^2 ($R^2 = 0$), además de pre-

Cuadro 3. Estimación del L_{∞} en el modelo promedio entre el U-Gompertz y el U-Logístico.

Modelos	L_{∞}	$L_{\infty es}$	Var	EE	VI	VS
Logístico	73,0	20,7	10,9	14,9	5,8	35,5
Gompertz	80,1	57,4	26,0	16,7	40,8	74,1
Promedio		78,1		31,6	46,6	109,6

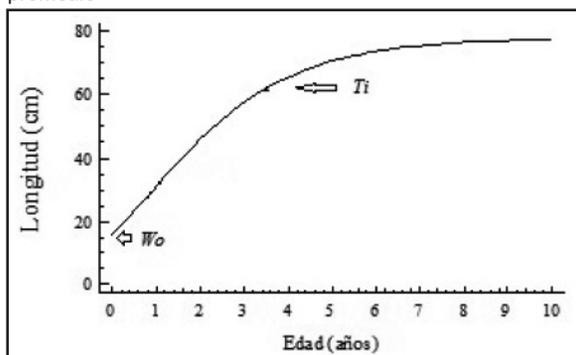
$L_{\infty es}$ = L_{∞} estimado; **Var** = Varianza; **EE** = Error estimado; **VI** = Valor inferior; **VS** = Valor superior.

Cuadro 4. Promedio e intervalos de confianza de los parámetros de crecimiento estimados a partir de los modelos U-Gompertz y U-Logístico.

Parámetros	Promedio	I.C.
L_{∞}	78,1	46,6 - 109,6
K	0,205	0,077 - 0,333
T_i	3,4	2,3 - 4,5
W_0	15,6	8,6 - 22,7

I.C. = Intervalos de confianza.

Figura 1. Curva de crecimiento en longitud según el modelo promedio



sentar valores no esperados (irreales) de los parámetros K y T_i (Cuadro 5). Por tal razón, dicho modelo fue descartado de la inferencia de modelos múltiples, para evitar alteraciones en los resultados [20,22]. Entre los modelos U-von Bertalanffy y U-Gompertz el primero fue el más preciso en el ajuste de los datos, por presentar el valor mínimo (AIC_{min}) del AIC (Cuadro 6); mientras que el modelo U-Gompertz, no produjo un ajuste sustancial de dichos datos según el ΔAIC ($\Delta AIC > 10$) y el valor del W_i ($W_i = 0$; Cuadro 6).

De allí que el mejor ajuste del total de datos retro-calculados lo produjo el modelo U-von Bertalanffy; un resultado que verificó los obtenidos anteriormente del estudio del crecimiento de *P. orinocoense* (*P. fasciatum*) [7], así como los resultados de la evaluación de la población a partir de estos resultados [12]. Los valores del L_{∞} y K , estimados con el modelo U-von Bertalanffy (Cuadro 5) fueron aproximadamente igual a los estimados utilizando el modelo tradicional de von Bertalanffy para los mismos datos ($L_{\infty} = 112,6$; $K = 0,080$) [7]

Cuadro 5. Parámetros y estadísticos estimados por los modelos a partir de datos retro-calculados.

	L_{∞}	K	T_i	RSS	R^2
Totales					
ECVB	113,2	0,061	22	4449	98
Logístico	69,6	42,4	-3158	1,269	0
Gompertz	70,1	0,104	3,3	4831	98
Subconjunto					
ECVB	59,8	0,253	7,4	6122	92
Logístico	69,2	0,745	4,6	3052	96
Gompertz	77,5	0,085	3,6	3031	96

ECVB = Modelo U- von Bertalanffy.

Cuadro 6. Criterio de información de Akaike (AIC) de los modelos ajustados a los datos de González et al. (2010).

	AICc	$\Delta AICc$	W_i	W_i (%)
Totales				
ECVB	609,6 ¹	0	1	100
Gompertz	638,9	29,3	0	0
Subconjunto				
ECVB	601,1	176,7	0	0
Logístico	426,0	1,688	0,30	30
Gompertz	424,3 ¹	0	0,70	70

ECVB = Modelo U- von Bertalanffy; 609,6¹ y 424,3¹= AIC_{min}

El R^2 estimado a partir del ajuste no lineal de los modelos candidatos aplicados al subconjunto de datos, que excluyó las edades de uno y dos años, demostró que los tres modelos candidatos explicaron adecuadamente la variación de los datos de longitud-edad (Cuadro 5); sin embargo, al contrario del ajuste de los datos totales, el AIC demostró que el modelo U-von Bertalanffy no ajustó sustancialmente dichos datos, según los valores del ΔAIC_c ($\Delta AIC_c > 10$) y el valor del W_i ($W_i = 0$; Cuadro 6). Estos resultados comprobaron que un valor relativamente alto de R^2 no implica un buen ajuste de los datos, y que la selección más precisa del modelo de mejor ajuste se obtiene utilizando el AIC [25-27].

Al igual que con los datos de longitud-edad observados, que también excluyeron los peces de uno y dos años de edad, el modelo que produjo un mejor ajuste del subconjunto de datos fue el de Gompertz según el AIC_{min} y el valor del W_i (Cuadro 6), aunque sin mostrar superioridad sobre el modelo Logístico ($W_i < 90\%$), razón por la cual se procedió también a calcular un modelo promedio.

El valor del L_∞ que representó al modelo promedio en el subconjunto de datos fue de 75,0 (intervalo 44,1-105,9) cm de longitud total; el de K , 0,284 (intervalo 0,108-0,459) año⁻¹; el de T_p , 3,9 (intervalo 2,2-5,6) años y el de W_0 , 9,1 (intervalo 4,9-13,4) cm de longitud total, que fueron aproximadamente igual a los estimados en el trabajo a partir de los datos de longitud-edad observados (Cuadro 4).

Aparentemente, cuando se utilizan datos de longitud-edad que incluyen todas las clases de edades, el modelo de von Bertalanffy produce un mejor ajuste; mientras que en muestras donde faltan los peces más jóvenes (edades de uno y dos años), los datos de longitud-edad son mejor ajustados por otros modelos como el de Gompertz y el Logístico [20,29].

Los datos relativamente completos de longitud-edad facilitan el modelaje del crecimiento desde un tamaño inicial hasta uno asintótico, con una tasa de crecimiento gradualmente decreciente y sin punto de inflexión en la curva, como es característico del modelo de von Bertalanffy [7,17]. Posiblemente, el valor relativamente alto del T_i estimado por el modelo U-von Bertalanffy en el conjunto completo de datos retro-calculados ($T_i = 22$ años; Cuadro 5), se deba a la falta de puntos de inflexión en la curva de dicho modelo.

La selección del modelo de mejor ajuste no sólo depende del patrón de crecimiento de la especie, sino también de la calidad y las características del conjunto de datos en cuanto a la información que contienen, donde el objetivo del AIC no solo es modelar los datos, sino también poner de manifiesto esta información [21,28].

Cuando la información de los datos incluye solamente peces juveniles, como en el caso de las lagunas de la confluencia de los ríos Solimões y Japurá del estado de Amazonas en Brasil, los datos no soportan bien el modelo de von Bertalanffy y se ajustan mejor a otros modelos como el Logístico y de Gompertz [20]; sin embargo, datos compuestos en su mayor parte por peces adultos, tampoco se ajustan bien al modelo de von Bertalanffy [20], como en el caso que nos atañe.

Gran parte de los estudios del crecimiento en peces se han realizados utilizando *a priori* el modelo de von Bertalanffy y generalmente con datos provenientes de la pesca artesanal, donde se ven afectados los estimados de los parámetros de crecimiento por la ausencia en los datos de peces muy jóvenes o muy viejos, debido a la selectividad de las artes de pesca [29]. Cuando los datos provienen de la pesca artesanal, es recomendable, por lo tanto, usar más de un modelo de crecimiento para seleccionar el que mejor describe la información de los datos disponibles, en lugar de estudiar el crecimiento en base al modelo único de von Bertalanffy.

En este sentido, es necesario revisar algunos trabajos como los realizados en *P. reticulatum* en la cuenca del río Cuiabá [14] y *P. punctifer* en la Amazonia boliviana [15], en las especies *P. corruscans* y *P. tigrinum* de la cuenca del río Cuiabá [16] y de la Amazonia boliviana [15] respectivamente, así como en *P. metaense* del río Apure en Venezuela [2], principalmente, si los estimados de los parámetros de crecimiento han sido utilizados para evaluar las poblaciones usando métodos como el de Beverton y Holt, el cual es muy sensitivo a los valores de L_∞ y K [12].

CONCLUSIONES

Los trabajos que hasta ahora se han hecho sobre el crecimiento de los bagres del Género *Pseudoplatystoma* han utilizado al modelo de von Bertalanffy como modelo único, seleccionado *a priori*, sin tomar en cuenta que

dicho modelo solo se ajusta a datos que incluyen todas las edades. En datos provenientes de la pesca artesanal, donde por efecto de la selectividad los peces jóvenes y los más viejos están excluidos, los modelos Logístico y de Gompertz son los que producen un mejor ajuste; no siendo suficiente utilizar solo el coeficiente de determinación R^2 para estimar el modelo que produce un buen ajuste, sino usar el criterio de la información de Akaike (AIC), que toma en cuenta el tipo de información contenida en los datos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento del trabajo, así como a la Dirección del Instituto Limnológico por la logística prestada.

REFERENCIAS

- [1] BUITRAGO-SUÁREZ, U.R. and BROOKS, M.B. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriforme: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512, 2007, p. 1-38.
- [2] PÉREZ, A.S. and FABRÉ, N.M. Life-history characteristics of *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei: Siluriformes: Pimelodidae) from the northwestern Orinoco River Basin. *Neotropical Ichthyology*, 16(1), 2018, e160140, DOI: 10.1590/1982-0224-20160140.
- [3] GONZÁLEZ, A., MENDOZA, J., AROCHA, F. y MÁRQUEZ, A. Caracterización de la pesca artesanal en el río Orinoco sector Caicara-Cabruta. *Zootecnia Tropical*, 34(1), 2016, p. 23-35.
- [4] GONZÁLEZ, A.R. Bagres Pimelodidae del río Orinoco, *Pseudoplatystoma fasciatum*, composición química, pesquería, dinámica y evaluación de población. 1ª ed. Madrid (España): Editorial Académica Española (EAE), 2018, 53 p.
- [5] GONZÁLEZ, S.A.R., MENDOZA, J., AROCHA, F. y MÁRQUEZ, A. Selectividad de la red de enmalle en la captura del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* de la cuenca del Orinoco medio. *Zootecnia Tropical*, 26(1), 2008, p. 63-70.
- [6] KHAN, M.A., KHAN, S. and KHAN, S. Precision of age estimates in striped snakehead *Channa striata* (Bloch, 1793) from the Ganga River and its tributaries (rivers Gomti and Yamuna). *Journal Applied Ichthyology*, 33(2), 2017, p. 230-235.
- [7] GONZÁLEZ, S.A.R., MENDOZA, J., AROCHA, F. y MÁRQUEZ, A. Edad y Crecimiento del bagre rayado *Pseudoplatystoma orinocoense* de la cuenca del Orinoco medio. *Zootecnia Tropical*, 28(2), 2010, p. 283-293.
- [8] SPURGEON, J.J., HAMEL, M.J., POPE, K.L. and PEGG, M.A. The Global Status of Freshwater Fish Age Validation Studies and a Prioritization Framework for Further Research. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23, 2015, p. 329-345.
- [9] PRIYANKA, M., TYAGI, R.K. and AMITABH, CH.D. Studies on age, growth and age composition of commercially important fish species, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) from the tributary of the Ganga river, India. *European Journal of Experimental Biology*, 5(2), 2015, p. 16-21.
- [10] KLEIN, Z.B., BONVECHIO, T.F., BOWEN, B.R. and QUIST, M.C. Precision and Accuracy of Age Estimates Obtained from Anal Fin Spines, Dorsal Fin Spines, and Sagittal Otoliths for Known-Age Largemouth Bass. *Southeastern Naturalist*, 16(2), 2017, p. 225-234.
- [11] QUIST, M.C. and ISERMAN, D.A. Age and growth of fishes: Principles and Techniques. 1ª ed. New York (EEUU): American Fisheries Society, 2017, 359 p.
- [12] GONZÁLEZ, S.A.R., MENDOZA, J., AROCHA, F. y MÁRQUEZ, A. Tasa de explotación y rendimiento sostenible de *Pseudoplatystoma fasciatum* en el eje Caicara - Cabruta del Orinoco. *Zootecnia Tropical*, 30(2), 2012, p.155-169.
- [13] REID, S. La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en la cuenca del río Apure, Venezuela. *Revista UNELLEZ, Ciencia y Tecnología*, 1(1), 1983, p. 13-41.
- [14] MATEUS, L.A.F. e PENHA, J.M.F. Dinâmica populacional de quatro espécies de grandes bagres na bacia do rio Cuiabá, Pantanal norte, Brasil (Siluriformes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Zoología*, 24(1), 2007, p. 87-98.
- [15] INTURIAS, C.A.D. Edad, crecimiento y reproducción de *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en la Amazonía boliviana [Tesis Maestría Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Ecología Acuática]. La Paz (Bolivia): Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, 2008, 91 p.
- [16] MATEUS, L.A.F. and PETRERE Jr., M. Age, growth and yield per recruit analysis of the pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) na bacia

- do rio Cuibá, Pantanal de Mato Grosso, Brasil. *Brazil Journal Biology*, 64(2), 2004, p. 257-264.
- [17] GONZÁLEZ, S.A.R., MENDOZA, J., AROCHA, F. y MÁRQUEZ, A. Edad y crecimiento del bagre dorado *Brachyplatystoma rousseauxi* del Orinoco medio según anillos de la espina pectoral. *Zootecnia Tropical*, 33(2), 2015, p. 153-161.
- [18] NAMIKI, C., KATSURAGAWA, M. and ZANI-TEIXEIRA, M.L. Growth and mortality of larval *Muctophum affine* (Muctophidae, Teleostei). *Journal of Fish Biology*, 86(1), 2015, p.1335-1347.
- [19] FEITOSA, C.V., ARAUJO, M.E. and FERREIRA, B.P. Estimates on age, growth and mortality of the french angelfish *Pomacanthus paru* (Bloch, 1787) (Teleostei: Pomacanthidae) in the southwestern Atlantic. *Journal of Applied Ichthyology*, 33(3), 2017, p. 409-414.
- [20] COSTA, L.R., BARTHEM, R.B., ALBERNAZ, A.L., BITTENCOURT, M.M. and VILLACORTA-CORRÊA, M.A. Modelling the growth of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in floodplain lakes: model selection and multimodel inference. *Brazil Journal Biology*, 73(2), 2013, p. 397-403.
- [21] KATSANEVAKIS, S. and MARAVELIAS, D. Modelling fish growth: multi-model inference as a better alternative to a priori using von Bertalanffy equation. *Fish and Fisheries*, 9(1), 2008, p. 178-187.
- [22] ARAGÓN-NORIEGA, E.A., ALCÁNTARA-RAZO, E., VALENZUELA-QUIÑONEZ, W. and RODRÍGUEZ-QUIROZ, G. Multi-model inference for growth parameter estimation of the bigeye croaker *Micropogonias megalops* in the upper Gulf of California. *Journal of Marine Biology and Oceanography*, 50(1), 2015, p. 25-38.
- [23] MARINOVIC, Z., LUJIC, J., BOLIĆ-TRIVUNOVIC, V. and MARKOVIĆ, G. Comparative study of growth in *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) and *Rutilus rutilus* (L., 1758) from two Serbian reservoirs: Multi-model analysis and inferences. *Fisheries Research*, 173(1), 2016, p. 11-19.
- [24] ANSAH, Y.B. and FRIMPONG, A. Using model-base inference to select a predictive growth curve for farmed tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, 77(3), 2015, p. 281-288.
- [25] TJØRVE, E. and TJØRVE, K.M.C. A unified approach to the Richards-model family for use in growth analyses: Why we need only two model forms. *Journal Theoretical Biology*, 267(3), 2010, p. 417-425.
- [26] TJØRVE, K.M.C. and TJØRVE, E. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards. *Plos One*, 12(6), 2017, e0178691.
- [27] OLAYA-OCHOA, J. Modelos de regresión: El problema de la selección de variables. Escuela de Estadística, Universidad del Valle, Cali, Colombia [en línea]. 2016. Disponible: https://campusvirtual.univalle.edu.co/moodle/pluginfile.php/938562/mod_resource/content/1/QuintaSesionMdeR.pdf [citado 13 de febrero 2016].
- [28] BURNHAM, K.P. and ANDERSON, D.R. Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach. 1ª ed. New York (USA): Springer, 2002, 488 p.
- [29] ARZOLA-SOTELO, E.A. Aplicación del enfoque multimodelo para la evaluación del crecimiento individual de la curvina golfina *Cynoscion othonopterus* en el Alto Golfo de California. *Ciencia Pesquera*, 22(1), 2014, p. 79-88.[30] BA, A., DIOUF, K., GUILHAUMON, F. and PANFILI, J. Slow growth of the overexploited milk shark *Rhizoprionodon acutus* affects its sustainability in West Africa. *Journal Fish Biology*, 87(1), 2015, p. 912-929.

Efecto entre microorganismos eficientes y fitomas-e en el incremento agroproductivo del frijol

Effect between efficient microorganism and fitomas-e on agroproductive increase of common beans

Efeito entre os microorganismos eficientes e fitomas-e no incremento agroproductivo do feijoeiro

ALEXANDER CALERO-HURTADO^{1*}, ELIENI QUINTERO-RODRÍGUEZ²,
ANERY PÉREZ-DÍAZ³, DILIER OLIVERA-VICIEDO¹, KOLIMA PEÑA-CALZADA¹,
JANET JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ⁴.

RESUMEN

El uso de bioestimulantes vegetales conjuntamente con microorganismos eficientes puede ser una alternativa para cambiar el metabolismo de las plantas y, en conse-

Recibido para evaluación: 1 de Agosto de 2018.

Aprobado para publicación: 22 de Noviembre de 2018.

- 1 Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp). Candidatos a doctor(a) en Agronomía (Producción Vegetal). Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- 2 Empresa Agropecuaria Agroindustrial "Melanio Hernández". Ingeniera Agrónoma. Taguasco, Sancti Spíritus, Cuba.
- 3 Centro Universitario Municipal de Taguasco "Enrique José Varona" (CUM), Universidad de Sancti Spíritus "José Martí Pérez". Profesora. Sancti Spíritus, Cuba.
- 4 Universidad de Sancti Spíritus "José Martí Pérez" (Uniss). Doctora en Ciencias Biológicas. Sancti Spíritus, Cuba.

Correspondencia: alexcalero34@gmail.com

cuencia, mejorar el rendimiento del cultivo de frijol. Bajo esta circunstancia, se evaluó el efecto entre microorganismos eficientes y Fitomas E en el incremento productivo del frijol común en dos épocas de siembra. Dos experimentos fueron desarrollados, de octubre de 2014 a abril de 2015. Los tratamientos utilizados fueron: el control, inoculación y aplicaciones foliares de microorganismos eficientes, inoculación y aplicaciones foliares con Fitomas E y la asociación entre estos. Los indicadores evaluados fueron: el número de hojas por planta, materia seca, número legumbres por planta, granos por legumbre, masa de 100 granos y el rendimiento. Los resultados mostraron que las mayores respuestas, fueron obtenidas en época de siembra intermedia y la producción de frijol fue favorecida con la aplicación asociada entre microorganismos eficientes y Fitomas E, comparado con las formas individuales, porque aumentó el número de hojas por planta, masa seca, cantidad de legumbre por planta, promedio de granos por legumbre, la masa de 100 granos y producir $1090,0 \text{ kg.ha}^{-1}$ en época intermedia y $660,0 \text{ kg.ha}^{-1}$ en la tardía en relación al control.

ABSTRACT

The use of plants biostimulants jointly with efficient microorganisms may be an alternative to change the change plant metabolism and consequently, improve bean crop yield. Under this circumstance, it's to evaluate the effect between efficient microorganisms and Fitomas E in the productive increase of common bean in two sowing periods. Two experiments were developed, from October 2014 to April of 2015. The treatments applied were, a control, inoculation and foliar applications of efficient microorganisms, inoculation and foliar applications with Fitomas E and the association between these. The indicators evaluated were: number of leaves per plant, dry matter, number of legumes per plant, grains per legume, mass of 100 grains and yield. The results showed that the higher responses was obtained in intermediate and season the common bean production was achieved with the associated application between efficient microorganism and Fitomas E, compared with individual form of them and increase the indicators such as the number of leaves per plant, dry matter, number of legumes per plant, grains per legume, mass of 100 grains (g) and produce $1090,0 \text{ kg.ha}^{-1}$ in the intermediate season and $660,0 \text{ kg.ha}^{-1}$ in late season in relation to the treatment without application.

RESUMO

O uso de bioestimulantes vegetais juntamente com microorganismos eficientes podem ser uma alternativa para alterar o metabolismo das plantas e, conseqüentemente, melhorar a produtividade do feijoeiro. Sob esta circunstância, o efeito avaliado entre os Microorganismos eficientes e Fitomas E no aumento da produção de feijão em duas épocas de plantio, dois experimentos foram desenvolvidos de outubro de 2014 até abril de 2015. Os tratamentos avaliados foram: controle, inoculação e aplicações foliares de microorganismos eficientes, inoculação e aplicações foliares de Fitomas E, e a associação entre estes. Os indicadores avaliados foram: número de folhas por planta, massa seca, número de legumes por planta, grãos por legumes, massa de 100 grãos

PALABRAS CLAVE:

Aplicación foliar, Bioproductos, Época de siembra, *Phaseolus vulgaris*, Productividad.

KEYWORDS:

Foliar application, Bioproducts, Sowing season, *Phaseolus vulgaris*, Productivity.

PALAVRAS-CHAVE:

Aplicação foliar, Bioproductos, Épocas de plantio, *Phaseolus vulgaris*, Produtividade.

e o rendimento. Os resultados mostraram que as maiores respostas foram obtidas durante a estação intermediária de plantio e a produção de feijão foi favorecida com a aplicação associada entre os Microorganismos eficientes e Fitomas E, comparados com formas individuais, pois o número de folhas por planta aumentou, massa seca quantidade de leguminosa por planta, média de grãos por leguminosa, massa de 100 grãos e produção de 1090,0 kg.ha⁻¹ na estação intermediária e 660,0 kg.ha⁻¹ no final da estação em relação ao controle.

INTRODUCCIÓN

El frijol es la leguminosa de grano más importantes para el consumo humano directo en el mundo. En términos nutricionales, estos granos son una gran fuente de proteína y son ricos en minerales (especialmente hierro y zinc) y vitaminas [1].

El nivel de producción del frijol en Latinoamérica y en Cuba son relativamente bajos, no se logran los resultados alcanzados por países como China, Brasil, entre otros, principalmente porque existen factores que afectan el rendimiento del cultivo, además de los efectos del cambio climático, la presencia de plagas y la deficiencia de nutrientes en los suelos [2].

El frijol común puede sembrarse en Cuba desde septiembre hasta febrero y este período se divide en tres épocas de siembra, las tempranas (01 de septiembre a 15 de octubre), las óptimas o intermedias (16 de octubre a 30 de noviembre) y las tardías (01 de diciembre a 10 de febrero) [3].

En respuesta a la utilización inadecuada de los fertilizantes químicos y los problemas edáficos, sociales y ambientales que causan, se estimula cada vez más, la implementación de estas prácticas agrícolas más sostenibles [2]. Por otra parte, para mejorar la producción agrícola, existen una gama de bioestimulantes, que promueven el equilibrio fisiológico de las plantas, lo que favorece la expresión del potencial genético y la productividad, a través del crecimiento y desarrollo de los órganos radicales y aéreos [4].

El Fitomas-E es un derivado de la industria azucarera cubana que actúa como bionutriente vegetal con marcada influencia antiestrés, presenta efecto bioestimu-

lante, porque potencializa el crecimiento y desarrollo de los cultivos [5], varios estudios han demostrado su efecto bioestimulante en el cultivo del frijol [6-8].

Por otra parte, el papel de los microorganismos en la mejora de la disponibilidad de nutrientes para las plantas es una estrategia importante y está relacionada con las prácticas agrícolas climáticamente inteligentes [9,10]. Interacciones benéficas se han reportado entre las plantas y los microorganismos en el medio ambiente y las funciones de los ecosistemas derivados [11].

El rol de los microorganismos eficientes (ME), una tecnología descubierta y desarrollada por el profesor Teuro Higa [12], quien encontró, que el éxito de su efecto estaba en su mezcla. Esta tecnología ha sido investigada, desarrollada, aplicada y utilizada en más de 80 países del mundo [13]. Otros autores refieren que el principio fundamental de esta tecnología consiste en la introducción de un grupo de microorganismos benéficos para mejorar las condiciones del suelo y suprimir la putrefacción (incluyendo enfermedades) [14].

La utilización de los microorganismos eficientes ha resultado favorable para la agricultura, diversos estudios han reportados los efectos benéficos, porque su introducción a favorecido y beneficiado a los agricultores [15] y la producción de varios cultivos, como en hortalizas [16-18], maíz [19] y en frijol [20].

Escasos estudios han utilizados la asociación de microorganismos eficientes con Fitomas E, en este sentido [21] aplicaron varios biopreparados de microorganismos eficientes mezclado con Fitomas E en el cultivo del frijol común y lograron incrementar los indicadores agroproductivos evaluados.

Si es conocido que la utilización de los biofertilizantes y bioestimulantes desde el establecimiento inicial del cultivo, son esenciales para el éxito de la producción, la hipótesis a constatar, es que la aplicación de microorganismos eficientes asociada con Fitomas E podría estimular y aumentar la producción de frijol común. Para comprobar nuestra hipótesis, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la utilización asociada entre microorganismos eficientes y Fitomas E en el incremento productivo del frijol común en dos épocas de siembra.

MÉTODO

Localización del experimento

La investigación se desarrolló en las áreas de la Cooperativa de Créditos y Servicios Mártires de Taguasco" (22°6'17.588"N;79°22'33.544"O), en el municipio de Cabaiguán, provincia de Sancti Spiritus, Cuba, durante los meses de octubre de 2014 a abril de 2015.

Material vegetal

Se utilizó el cultivar Bat- 304, procedente de la Empresa de Semillas, con un 96% de germinación, la siembra se realizó a la distancia de 0,60 m entre hileras y 0,05 m entre plantas. Este cultivar presenta granos de color rojo, de tamaño medio, con potencial de rendimiento de 2,3 ton.ha⁻¹, hábito de crecimiento tipo I y un ciclo de 72 a 77 días [3].

Características y condiciones climatológicas

Las variables climáticas fueron registradas por la Estación de Recursos Hidráulicos del Municipio de Cabaiguán, situada a 1,5 km del lugar, la temperatura media diaria fue de 23,15°C, la humedad relativa media diaria 85,33% y la precipitación pluvial acumulada de 112,72 mm, durante el desarrollo de los experimentos. El agroecosistema se caracteriza por ser llano (90 msnm), con predominio de los vientos alisios, con dirección predominante de norte-sur, condiciones que favorecen el desarrollo del cultivo del frijol común.

Diseño experimental y tratamientos

Se realizaron dos experimentos, los cuales fueron dispuestos en diseños en bloques al azar, con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, el tamaño de las parcelas fue de 10 m² y el área efectiva de 3,60 m². El primer experimento fue desarrollado entre los meses de octubre de 2014 a enero de 2015 y el segundo de enero a abril de 2015. Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Control absoluto: sin inocular y sin fertilizar.
2. Inoculación a las semillas a 50 mg.g⁻¹ (2 horas) y aplicaciones foliares de microorganismos eficientes (ME) a la concentración de 100 mg.L⁻¹.

3. Inoculación a las semillas a 50 mg.g⁻¹ (2 horas) y aplicaciones foliares de Fitomas E (FE) a la dosis de 2,0 L.ha⁻¹.

4. Inoculación a las semillas a 50 mg.g⁻¹ (2 horas) con ME más aplicaciones foliares de FE a la dosis de 2,0 L.ha⁻¹.

Las aspersiones foliares fueron aplicadas a partir de la etapa V3 hasta la R5 (una aplicación por etapa), con apoyo de una asperjadora manual (ECHO MS-21H) de 7,6 L de capacidad. El manejo agrotécnico se realizó según la guía tecnológica para el cultivo [3], sin la utilización de fertilizantes químicos u orgánicos.

Características de los productos

Los bioestimulantes fueron obtenidos en la Sucursal de Labiofam de Sancti Spiritus. EL bioproducto Fitomas E, es un formulado obtenido por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), el cual se presenta en forma líquida y compuesto por 150 g.L⁻¹ de extracto orgánico, 55 g.L⁻¹ de Nitrógeno total, 60 g.L⁻¹ de K₂O y 31 g.L⁻¹ de P₂O₅. El inóculo de microorganismos eficientes compuesto por *Bacillus subtilis* B/23-45-10 Nato (5,4 10⁴ UCF.mL⁻¹), *Lactobacillus bulgaricum* B/103-4-1 (3,6 10⁴ UCF.mL⁻¹), y *Saccharomyces cerevisiae* L-25-7-12 (22,3 10⁵ UCF.mL⁻¹), con certificado de calidad emitido por ICIDCA, código R-ID-B-Prot-01-01, fue adquirido en la Sucursal de Labiofam de Sancti Spiritus".

Tipo de suelo y principales características

El suelo fue clasificado como Pardo Sialítico Carbonatado [22], conocido como Cambisol [23]. Este tipo de suelo con perfil ABC, de mediana a poca profundidad, arcillosos con predominio de arcillas del tipo 2:1 Montmorillonita, el color predominante es pardo o pardo oscuro y verde azules en ocasiones cuando existen condiciones de oxidación en el medio, por el mal drenaje o compactación. Estos representan estadios jóvenes de formación del suelo y sus principales limitantes agroproductivas son, la poca profundidad efectiva y la susceptibilidad a la compactación, cuando son manejados inadecuadamente.

Variables evaluadas

Las observaciones de las variables evaluadas correspondieron a los criterios expuestos por descriptores

recomendados en las etapas de crecimiento y desarrollo del cultivo [24].

Los muestreos fueron realizados en el área efectiva de las parcelas (1,92 m²) y evaluadas 40 plantas por tratamientos, los indicadores morfofisiológicos evaluados fueron: el número de hojas por planta, materia seca (g planta⁻¹) en la etapa R5 y al finalizar el ciclo del cultivo (R9) fueron evaluados el número legumbres por planta, granos por legumbre, masa de 100 granos (g) y el rendimiento (kg ha⁻¹).

Análisis estadísticos

Los datos fueron procesados en el software estadístico AgroEstat® y analizados por un análisis conjunta de experimentos [25]. La distribución normal de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para la bondad de ajuste y se aplicó la prueba Dócima de Levene para evaluar la homogeneidad de la varianza. Cuando existió normalidad y homogeneidad se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) y cuando este fue significativo al 5% de probabilidad de error, las medias fueron comparadas por la prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

El número de hojas por planta mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos evaluados en las dos épocas de siembra del cv. Velazco largo (figura 1). La época intermedia mostró mayores resultados de los tratamientos en el incremento de este indicador en relación a la tardía. En los dos periodos la utilización asociada de microorganismos eficientes (ME) y Fitomas E (FE), mostró lo mayores resultados comparados con la aplicación individual de ME y FE y el tratamiento control en ambas épocas, con aumentos en relación a este último de 8,88 y 7,64 hojas por planta, lo que significó un incremento de 58,12% en intermedia y en la tardía de 58,63%.

Fueron demostrados los efectos positivos de la aplicación conjunta entre ME y FE, en el incremento de la producción de hojas por planta. En este sentido [26] expresaron que la aplicación foliar de microorganismos eficientes, mejoran el crecimiento del follaje (22%), aspecto que aumenta el área fotosintética, mayor elaboración de nutrimentos, materia seca acumulada y el rendimiento. La utilización de Fitomas E en el frijol común

se comporta como antiestrés, estimulante y activador de los procesos fisiológicos [5]. Resultados positivos en el incremento de los indicadores morfológicos del frijol fueron logrados por [20] con la aplicación foliar e individual de microorganismos eficientes y Fitomas E, con la aplicación de este último de forma individual aumentaron el número de hojas por planta a los 25 y 30 días posteriores a la germinación en relación al tratamiento sin aplicación. Los resultados obtenidos en el trabajo corroboran el efecto beneficioso obtenido por [21] con la aplicación mezclada de microorganismos eficientes (ME-50 y LEBAME) con Fitomas E en época intermedia, porque incrementó el número de hojas por planta en el cv. Bat-304 de frijol común, a los 20 y 42 días posteriores después de la germinación comparados con el tratamiento sin aplicación. Con la inoculación de microorganismos eficientes [27] aumentaron el número de hojas por planta en el cultivo de la fresa en relación al tratamiento sin inoculación.

La masa seca de las plantas del cv. Velazco largo mostraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos en los dos periodos de siembra utilizados (figura 2), con destaque para la época intermedia en

Figura 1. Número de hojas por planta. Letras mayúsculas difieren entre tratamientos para las épocas de siembra y letras minúsculas difieren entre tratamientos dentro de cada periodo, según Tukey ($p \leq 0,05$).

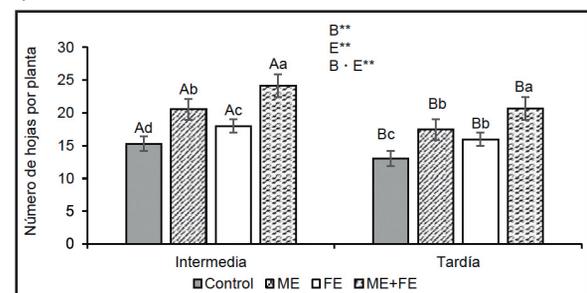
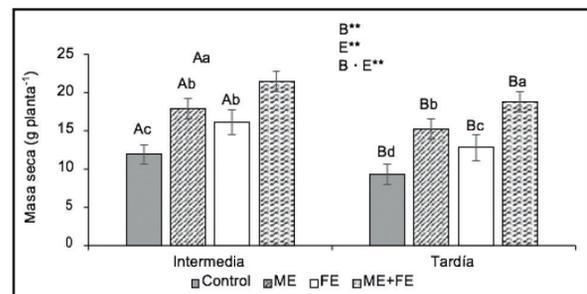


Figura 2. Efecto de los tratamientos en el comportamiento de la masa seca.



relación a la tardía porque mostró mayores resultados en el incremento de este indicador. En ambos periodos todos los bioproductos aumentaron la masa seca de las plantas en relación al tratamiento control, los mayores resultados fueron alcanzados con la utilización combinada de ME+FE, comparados con la aplicación de ME y FE individual y el control, con aumentos en relación a este último de 9,51 g.planta⁻¹ en la época intermedia y 7,64 g.planta⁻¹ en la tardía, lo que significó un incremento de 79,92 y 101,51%, respectivamente. Los resultados analizados en este indicador muestran que el desarrollo de las plantas, se fundamenta porque los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en una serie de transformaciones químicas de los suelos, por lo tanto, influyen en la disponibilidad de macro y micronutrientes para las plantas [28]. Con la combinación combinada de microorganismos eficientes y *Trichoderma harzianum*, [17] obtuvieron en incremento de la masa seca de las plántulas de cebolla comparada con el tratamiento control. En este sentido, [20] aumentaron la masa seca de las plantas de frijol común con la aplicación foliar de Fitomas E individual y la mezcla de este con varios biopreparados de microorganismos eficientes en relación a la variante sin aplicación.

El número de legumbres por planta del cv. Velazco largo mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre todos tratamientos utilizados en ambas épocas de siembra (figura 3). Los tratamientos en época intermedia lograron mayores resultados comparado con la tardía en el incremento de este indicador. Todos los bioproductos aumentaron la cantidad de legumbres por planta en relación al tratamiento control en ambos periodos, con destaque para la utilización combinada de ME+FE, en la época intermedia, aunque no mostró diferencia con la utilización de ME individual logró aumentar la cantidad de legumbres por planta en 10,21, lo que significó un incremento de 104,18%. En el periodo tardío la aplicación combinada con ME+FE, mostró diferencias en relación a la aplicación individual de los bioproductos ME y FE y el tratamiento control, con un aumento en relación a este último de 9,80 legumbres por planta, lo que significó un incremento de 124,52%.

El número de frutos, legumbres o vainas por planta es un indicador que influye directamente en el rendimiento de este cultivo, algunos estudios han demostrado el efecto bioestimulante de la aplicación individual del Fitomas-E en la mejora de la nutrición, la floración y el cuajado de los frutos [7].

Estos factores incrementan la producción de frutos por planta [6,8] resultados que aumentaron el desarrollo de esta variable con en relación a la no aplicación del bioproducto. Por su parte [20], demostraron con la aplicación individual de microorganismos eficientes y Fitomas E un incremento de esta variable en relación a la no utilización de estos, mientras que, [21] obtuvieron valores de este indicador superiores al tratamiento sin aplicación.

El promedio de granos por legumbres alcanzado por los tratamientos mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ellos en ambas épocas de siembra (figura 4). En la época intermedia se alcanzaron los mayores resultados de los tratamientos de este indicador en relación a la tardía. En ambos periodos todos los bioproductos superaron al tratamiento control, con destaque para la utilización asociada de microorganismos eficientes (ME) y Fitomas E (FE), porque superó la aplicación individual de ME y FE y logró incrementos de 25,32% en la época intermedia y 58,63% en la tardía, en relación al tratamiento sin aplicación.

Figura 3. Efecto de los tratamientos en el comportamiento del número de legumbres por planta.

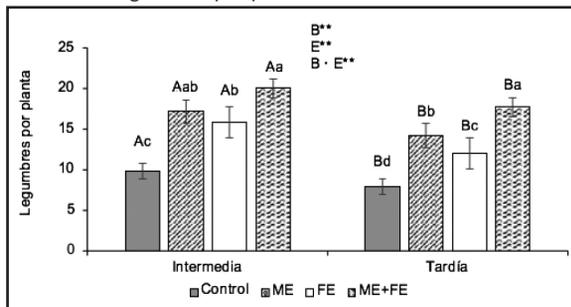
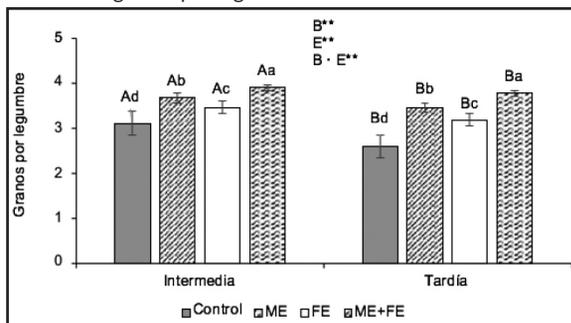


Figura 4. Efecto de los tratamientos en el comportamiento del número de granos por legumbre.



El número de granos por fruto, legumbre o vaina es otro componente que influye proporcionalmente en relación al rendimiento del grano en este cultivo, diversos estudios han demostrado que la utilización de Fitomas-E, aumenta este criterio porque favorece la nutrición y el desarrollo fisiológico del cultivo. En este sentido, con la aplicación de este bioproducto aumentaron en 12,10 vainas por planta al resto de los tratamientos [8]. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron alcanzados por [21] quienes evaluaron la aplicación foliar individual de Fitomas E y mezclada con diferentes biopreparados de microorganismos eficientes incrementaron esta variable en relación al control sin aplicación, con el consecuente aumento del rendimiento.

La masa de 100 granos obtenidas en plantas del cv. Velazco largo mostraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos, tanto en la época de siembra intermedia como en la tardía (figura 5), con destaque para la primera en relación a la segunda porque mostró mayores resultados en el incremento de este indicador. En ambos periodos todos los bioproductos aumentaron la masa de 100 granos en relación al tratamiento control, los resultados más favorables fueron alcanzados con la utilización combinada de ME+FE, comparados con la aplicación de ME y FE individual y el tratamiento sin aplicación, con aumentos en relación a este último de 11,89 g en la época intermedia y 12,20 g en la tardía, lo que significó un incremento de 27,09 y 31,09%, respectivamente.

La masa de 100 granos o semillas es una variable determinante para el indicador rendimiento porque caracteriza y clasifica la producción de granos o semillas en este cultivo, el cv. Velazco largo de forma general presenta granos de tamaño grande porque estos presentan una masa superior a 40 g [24]. Resultados positivos en el incremento de este indicador fueron obtenidos con la aplicación individual de microorganismos eficientes y Fitomas E una masa promedio de 100 semillas superior al control sin aplicación [20]. En este sentido, la aplicación foliar de Fitomas E individual y la mezcla de este con varios biopreparados de microorganismos eficientes obtuvieron resultados positivos en relación al control sin aplicación [21].

El rendimiento medio alcanzado por los tratamientos sobre el cv. Velazco largo mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ellos en ambos periodos de siembra utilizados (figura 6). En la época intermedia

se alcanzaron las mayores productividades de los tratamientos en relación a la tardía. En ambos periodos todos los bioproductos superaron al tratamiento control, con medias productivas superiores para la utilización asociada de ME + FE, con respecto a la aplicación de ME y FE individual y producir 1,09 y 0,66 ton.ha⁻¹, lo que significó incrementos de 25,32% en la época intermedia y 58,63% en la tardía, en relación al tratamiento sin aplicación.

El rendimiento es un indicador importante para validar esta investigación. Hubo un incremento de la productividad del grano de frijol, con la aplicación asociada entre ME y FE, porque fueron incrementados la producción de hojas por planta, la masa seca, el número de legumbre por planta, el número de granos por legumbre y la masa de 100 granos en los periodos de siembra evaluados, con resultados superiores en la época de siembra temprana en relación a la tardía. El uso de microorganismos promotores del crecimiento (PGPM) ayuda a aumentar los rendimientos de los cultivos además de la protección convencional de las plantas [29,30]. Varios autores estudiaron y validaron el efecto bioestimulante del

Figura 5. Efecto de los tratamientos en el comportamiento de la masa de 100 granos.

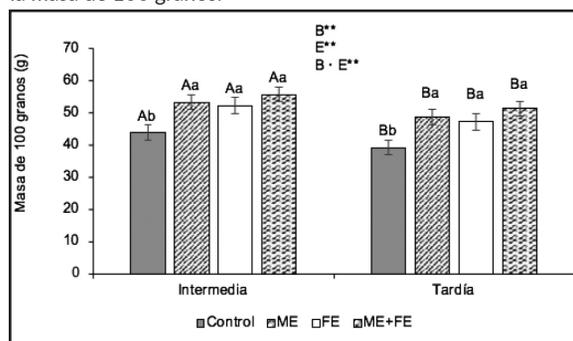
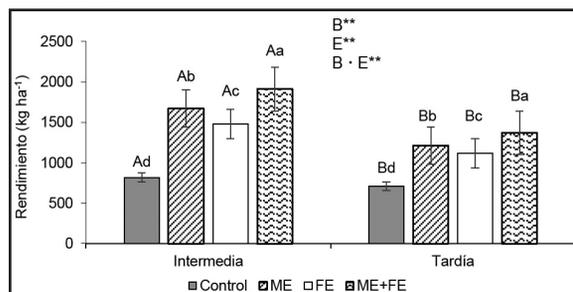


Figura 6. Efecto de los tratamientos en el comportamiento del rendimiento.



Fitomas E aplicado de forma foliar al incrementar el rendimiento en relación a la no utilización del bionutriente [6-8]. Efectos similares en el incremento del rendimiento fueron logrados con la aplicación individual de ME y FE comparado con la no aplicación de estos (control) [20], mientras que, con la aplicación foliar de Fitomas E individual y la mezcla de este con varios biopreparados de microorganismos eficientes alcanzaron un incremento del rendimiento en relación a la variante sin aplicación [21].

CONCLUSIONES

La utilización de microorganismos eficientes, Fitomas E y la asociación entre ellos alcanzaron mayores respuestas de los indicadores agroproductivos del cv. Velasco largo en la época de siembra intermedia en relación a la tardía. La producción de frijol común en los dos periodos de siembra fue favorecida con la aplicación asociada de ME + FE, comparado con los tratamientos con ME y FE individual y aumentar los indicadores como el número de hojas por planta, masa seca, cantidad de legumbre por planta, promedio de granos por legumbre, la masa de 100 granos y producir 1,09 ton.ha⁻¹ en época intermedia y 0,66 ton.ha⁻¹ en la tardía en relación al tratamiento sin aplicación.

REFERENCIAS

- [1] GARCÍA, P. *et al.* Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE*, 7(5), 2012, p. 1-7, DOI 10.1371/journal.pone.0038122.
- [2] MARTÍNEZ, L. *et al.* Efecto de productos bioactivos en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) biofertilizadas. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 2016, p. 165-171, DOI 10.13140/RG.2.1.1077.0165.
- [3] FAURE, B. *et al.* Guía técnica para la producción de frijol común y maíz. 1 ed. La Habana (Cuba): 2014, 33 p.
- [4] DOS ANJOS, D.N. *et al.* Biostimulants, macro and micronutrient fertilizer influence on common bean crop in Vitria da Conquista-Ba, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, 10(16), 2015, p. 1891-1897, DOI 10.5897/AJAR20149359.
- [5] MONTANO, R. *et al.* Fitomas E: Bionutriente derivado de la industria azucarera. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(3), 2007, p. 14-21.
- [6] RAMÍREZ, A.G. y ROSELL, P. Evaluación del bioestimulante Fitomas-E en el rendimiento agroproductivo del cultivo del frijol. *Revista Granmense de Desarrollo Local*, 1(3), 2017, p. 107-116.
- [7] GUEVARA, E. *et al.* Influencia de diferentes dosis de FitoMas-E en el frijol común. *Centro Agrícola*, 40(1), 2013, p. 39-44.
- [8] LÓPEZ, Y. y POUZA, Y. Efecto de la aplicación del bioestimulante Fitomas-e en tres etapas de desarrollo del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Delos: Desarrollo Local Sostenible*, 7(20), 2014, p. 1-10.
- [9] HAMILTON, C.E. *et al.* Mitigating climate change through managing constructed-microbial communities in agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 216, 2016, p. 304-308, DOI 10.1016/j.agee.2015.10.006.
- [10] PEREG, L. and MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 2015, p. 349-358, DOI 10.1016/j.soilbio.2014.10.020.
- [11] SINGH, J.S. *et al.* Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2016, p. 1-19, DOI 10.3389/fmicb.2016.00529.
- [12] HIGA, T. y PARR, J. Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles [en línea]. Maryland (USA): 2013. Department of Agricultural of United State. Disponible: http://fundases.com/userfiles/file/Microor_G_Benef_Efect.pdf.
- [13] ARIAS, A. Microorganismos eficientes y su beneficio para la agricultura y el medio ambiente. *Journal De Ciencia e Ingeniería*, 02(02), 2010, p. 42-45.
- [14] PEDRAZA, R.O. *et al.* Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnológica Agropecuaria*, 11(2), 2010, p. 155-164, DOI 10.21930/rcta.vol11_num2_art:206.
- [15] LUNA, M. y MESA, J. Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Agroecosistemas*, 4(2), 2016, p. 31-40.
- [16] OLIVERA, D. *et al.* Empleo de microorganismos nativos multipropósitos (MNM) en el comportamiento agro-productivo de cultivos hortícolas. *Agrotecnia de Cuba*, 39(7), 2015, p. 34- 42.

- [17] LIRIANO, R. *et al.* Evaluación de microorganismos eficientes y *Trichoderma harzianum* en la producción de posturas de cebolla (*Allium cepa* L.). Centro Agrícola, 42(2), 2015, p. 25–32.
- [18] NÚÑEZ, D.B. *et al.* Respuesta de *Daucus carota*, L. a la aplicación de microorganismos nativos en condiciones de organopónico. Centro Agrícola, 44(2), 2017, p. 29–35.
- [19] PEÑA, K. *et al.* Prácticas agrícolas sostenibles que incrementan los rendimientos de diferentes cultivos en Sancti Spiritus, Cuba. Agronomía Costarricense, 40(2), 2016, p. 117-127, DOI 10.15517/rac.v40i2.27391.
- [20] CALERO, A., QUINTERO, E. y PÉREZ, Y. Utilización de diferentes bioproductos en la producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Agro-tecnia de Cuba, 41(1), 2017, p. 1-13.
- [21] CALERO, A., PÉREZ, Y. y PÉREZ, D. Efecto de diferentes biopreparados combinado con FitoMas-E en el comportamiento agroproductivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Monfragüe Desarrollo Resiliente, 7(2), 2016, p. 161-176.
- [22] HERNÁNDEZ, A. *et al.* Clasificación de los suelos de Cuba. 1 ed. La Habana (Cuba): Ediciones INCA, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2015, 93 p.
- [23] MUELLER, L. SHEUDSHEN, A. and EULENSTEIN, F. En: Novel Methods for Monitoring and Managing Land and Water Resources in Siberia. 3 ed. Freising-Weihestephan (Germany): 2016, p. 563-571.
- [24] CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. 1 ed. Cáliz (Colombia): CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1987, 56 p.
- [25] BARBOSA, J.C. y MALDONADO, W. AgroEstat®. Sistema de análise estatísticos para ensaios agrônômicos. 1 ed. Jaboticabal (Brasil): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), 2015.
- [26] DÍAZ, O., MONTERO, D.M. y LAGOS, J.A. Acción de microorganismos eficientes sobre la actividad de intercambio catiónico en plántulas de Acacia (*Acacia melanoxylon*) para la recuperación de un suelo del municipio de Mondoñedo, Cundinamarca. Revista Colombia Forestal, 12, 2009, p. 141-160, DOI 10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2009.1.a10.
- [27] ALVAREZ, M. *et al.* Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). Scientia Agropecuaria, 9(1), 2018, p. 33-42, DOI 10.17268/sci.agropecu.2018.01.04.
- [28] QUEIROZ, A.Q. and PERES, R.P. Nutrient concentration and accumulation by common bean according biostimulant application. Semina: Ciências Agrárias, 35(4), 2014, p. 2259-2272, DOI 10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2259.
- [29] MEENA, V.S. *et al.* Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. 1 ed. Nueva Delhi (India): Springer, 2016, 331 p.
- [30] RASHID, M.I. *et al.* Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. Microbiological Research, 183, 2016, p. 26-41, DOI 10.1016/j.micres.2015.11.007.

Efecto de la temperatura y velocidad del aire sobre la humedad final de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Effect of temperature and air speed on the final humidity of thyme (*Thymus vulgaris*)

Efeito da temperatura e velocidade do ar na umidade final de tomilo (*Thymus vulgaris*)

CARLOS OSVALDO VELÁSQUEZ-SANTOS¹, JULIÁN ALBERTO URIBE-GÓMEZ²

RESUMEN

El tomillo (Thymus vulgaris) es una planta utilizada en medicina tradicional. Sus propiedades, se deben a su aceite esencial. Es importante destacar que el timol, el aceite esencial y la hoja seca, están catalogados por la FDA de los EEUU como aditivos alimentarios aptos para el consumo humano. El artículo muestra los resultados para el proceso de secado del tomillo, cuyo objetivo principal es establecer la incidencia de la temperatura y velocidad del aire sobre el contenido de humedad final, eligiendo el rango óptimo de secado. Se utilizaron dos métodos para determinar la densidad del tomillo, el primero fue por desplazamiento en probeta, el segundo por destilación azeotrópica, encontrándose que el mas recomendado es este último. Se determinó por el segundo método la humedad en base húmeda, la cual fue del 80%. Por otro lado, mediante un diseño experimental por superficie de respuesta, se encontró que

Recibido para evaluación: 15 de Julio de 2018.

Aprobado para publicación: 7 de Diciembre de 2018.

- 1 Instituto Tecnológico Metropolitano, Facultad de Ingenierías. Magister en Gestión Energética Industrial. Medellín, Colombia.
- 2 Instituto Tecnológico Metropolitano, Facultad de ciencias económicas y administrativas. Magister en Gestión Tecnológica. Medellín, Colombia.

Correspondencia: julianuribe@itm.edu.co

la temperatura se presenta como el factor más significativo sobre la humedad final del tomillo con valor $p=0,0124$ con un nivel de significancia del 90%. A las condiciones de temperatura halladas se observa que el mejor caudal se ajusta a la región entre 2050 - 2100 rpm, que corresponden con la mejor región de temperaturas de 52- 53°C.

ABSTRACT

Thyme (*Thymus vulgaris*) is a plant used in folk medicine. Its properties, are due to its essential oil. It is important to note that thymol, essential oil and dried leaf are classified by the US FDA as food suitable for human consumption. The article shows the results for the drying process of the thyme, whose main objective is to establish the incidence of the temperature and air speed on the final humidity, choosing the optimum drying range. Two methods were used to determine the density of thyme, the first was by displacement in a test tube, the second by azeotropic distillation, finding that the most recommended is the latter one. The wet method was determined by the second method, which was 80%. On the other hand, by means of an experimental design by response surface, it was found that temperature is the most significant factor on the final moisture of thyme with p -value = 0,0124 with a level of significance of 90%. To the temperature conditions found, it is observed that the best flow rate is adjusted to the region between 2050 - 2100 rpm, which corresponds to the best temperature region of 52-53°C.

RESUMO

Tomilho (*Thymus vulgaris*) é uma planta utilizada na medicina popular. Suas propriedades, são devido ao seu óleo essencial. É importante notar que o timol, o óleo essencial e as folhas secas são classificados pela US FDA como alimento adequado para consumo humano. O artigo mostra os resultados para o processo de secagem do tomilho, cujo objetivo principal é estabelecer a incidência da temperatura e da velocidade do ar na umidade final, escolhendo a faixa ótima de secagem. Dois métodos foram usados para determinar a densidade do tomilho, o primeiro foi por deslocamento em um tubo de ensaio, o segundo por destilação azeotrópica, descobrindo que o mais recomendado é o último. O método úmido foi determinado pelo segundo método, que foi de 80%. Por outro lado, por meio de um planejamento experimental por superfície de resposta, verificou-se que a temperatura é o fator mais significativo na umidade final do tomilho com Valor- p = 0,0124 com um nível de significância de 90%. Às condições de temperatura encontradas, observa-se que a melhor vazão é ajustada para a região entre 2050 - 2100 rpm, o que corresponde à melhor região de temperatura de 52-53°C.

PALABRAS CLAVE:

Deshidratado, Caudal, Superficie de Respuesta, Especia.

KEYWORDS:

Dehydrated, Caudal, Response Surface, Spice.

PALAVRAS-CHAVE:

Desidratado, Caudal, Superfície de Resposta, Especiaria.

INTRODUCCIÓN

El tomillo es una planta aromática ampliamente utilizada como digestiva y medicinal durante mucho tiempo. Comúnmente utilizada en cocina tradicional mediterránea, también es útil para infusiones, y tratamientos de artritis, reumatismo e infecciones de pecho [1]. Es una planta con gran aceptación, originaria en la península ibérica y del norte de África, donde se comercializan sus derivados como lo son extractos, aceites y hojas [2]. Al igual que otras plantas aromáticas como la albahaca, el romero y el orégano, el tomillo es una especie muy comercializada, donde el 75% de las exportaciones van dirigidas a mercados ubicados en Estados Unidos, Inglaterra y Canadá, principalmente para fines culinarios. En Colombia existen aproximadamente 400 especies de plantas aromáticas y medicinales, con un crecimiento proyectado del 8% en la producción nacional. [3]

La deshidratación ha sido un método primario para la preservación de los alimentos a largo plazo, hasta que en épocas recientes se desarrollaron métodos de congelación, principalmente la deshidratación como proceso ha consistido en exponer el alimento al sol debajo de un lienzo plástico sobre un área cementada durante 4 días, volteando el material para garantizar un secado armonizado y evitar su fermentación [4], esto se ha llevado a cabo para la preservación de los granos, sin embargo, la práctica se ha extendido a otros tipos de alimentos [5]. El proceso de deshidratación ha permitido crear productos atractivos para el mercado tanto de consumo humano como animal, en el cual el producto obtenido conserva sus propiedades naturales lo que lo hace atractivo para el consumidor y en especial el impacto sobre su salud [6].

La deshidratación y sus métodos se han llevado a cabo para preservar la vida útil del producto, impactando principalmente en las etapas finales de la cadena de suministros de alimentos como almacenamiento, procesamiento, distribución y consumo, por lo tanto, las operaciones de deshidratado facilitan la preservación y el manejo de los alimentos, reduce el transporte y los costos de almacenamiento a través de la reducción de la densidad del material alimenticio [7].

Muchos estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto de los tratamientos de secado y deshidratación sobre plantas aromáticas [8], sin embargo, este artículo se centra en aplicar el proceso de deshidratación y el estudio de los efectos de 2 fuentes de variación de un secador para plantas medicinales [9], el cual permite procesar

productos como el tomillo, el orégano, la menta piperita, la albahaca, el estragón y otras plantas aromáticas y de condimento. En la mayoría de los casos, la deshidratación involucra la aplicación de diferentes condiciones de temperatura, la cual, si no es correctamente aplicada puede causar un daño irreversible [10] a la materia prima alimenticia y por lo tanto pérdidas económicas.

El secador ha sido modificado, implementándole un variador de velocidad marca General Electric Modelo AF 300 Mini para 2 kW de potencia y un Motor trifásico marca Baldor de 0,5 Hp (Caballos de fuerza), el cual posibilita variar la velocidad del motor, en este caso las revoluciones por minuto (RPM), esta adición permite regular el caudal de secado del ventilador, esto con el fin de encontrar el rango del caudal óptimo de secado y la temperatura. Con la reducción de la cantidad de agua disponible, hasta niveles seguros para almacenamiento se reducirá la actividad del agua y la velocidad de las reacciones químicas en el producto, así como el desarrollo de microorganismos. El alto contenido en agua en las células y tejidos de las plantas, en torno al 60-80%, hacen que el secado tenga una importancia fundamental para evitar la fermentación o degradación de los principios activos [11], así como también prevenir el crecimiento de bacterias, hongos e insectos que requieren de agua para iniciar su actividad metabólica [5].

La hipótesis principal a probar es como la temperatura y el caudal afectan de manera estadísticamente significativa la humedad final del tomillo. Existen referentes teóricos que indican de manera cualitativa que el tiempo de secado depende del flujo del aire, la temperatura y la humedad relativa del aire, es decir, de las condiciones de operación del proceso de secado [8]. Cuanto mayor es la temperatura y mayor flujo de aire, más rápido es el secado [12]. La temperatura de secado es determinada por la sensibilidad de los principios activos de la planta, por lo tanto, para cada especie, existe una temperatura ideal de secado. Las principales ventajas de realizar el secado son: la facilidad de conservación del producto hasta la estabilidad de los componentes aromáticos a temperatura ambiente durante un largo tiempo, la protección contra la degradación oxidativa y enzimática, reducir el peso y tamaño, no tener que refrigerarlo durante el transporte y almacenamiento y la disponibilidad del producto durante todas las épocas del año [13]. Finalmente, objetivo principal de este trabajo de investigación es establecer la incidencia de la temperatura y velocidad del aire sobre el contenido de humedad final, eligiendo el rango óptimo de secado.

MÉTODO

Determinación de la densidad del tomillo

Para determinar la densidad del tomillo, se utilizaron dos procedimientos, el primero consiste en determinar la densidad por desplazamiento en probeta de 100 mL de un objeto como es el tomillo que está previamente pesado en balanza electrónica marca OHAUS de 0,001 g de precisión, con la lectura del desplazamiento y el peso del tomillo, se calcula la densidad.

El segundo procedimiento para determinar la densidad del tomillo se basa en realizar una destilación azeotrópica, la cual consiste en colocar la muestra de tomillo en un volumen de benceno, luego se procede a destilar, el producto obtenido de la destilación se lee mediante un balón o probeta adecuados y con este volumen se calcula la densidad del tomillo.

Determinación del porcentaje de humedad en base húmeda del tomillo

Para determinar el porcentaje de humedad de la muestra se utilizó el método gravimétrico indirecto por desecación con estufa, que consiste en determinar la humedad en base húmeda de la muestra por calentamiento a 105°C.

Se pesó una muestra de tomillo en una balanza analítica marca OHAUS, con una resolución de 0,001 g, el peso fue de 30,55 g, se calentó la muestra por 4 horas a 105°C, hasta que diera peso constante, el cual fue de 5,6028 g, con este valor y el del peso inicial de la muestra se calculó el porcentaje de humedad de la muestra el cual fue del 81,66% de humedad en base húmeda.

El método de destilación azeotrópica, se basa en la destilación simultánea con un líquido inmiscible en proporciones constantes. es el más adecuado para especias como el tomillo, Para el caso en particular, la asociación americana de comercio de especias, en sus métodos oficiales analíticos recomienda el uso del Benceno en lugar del tolueno.

Siguiendo el procedimiento se tomó una cantidad de 100 mL de benceno cuyo punto de ebullición es de 80°C, se vertió en la muestra de 30,55 g, luego se realizó el proceso de destilación, y se recolectó el volumen de líquido destilado. Se calculó la humedad en base húmeda del tomillo, la cual fue del 80%.

Realización pruebas de secado

Para realizar las pruebas de secado, se dispuso de suficiente material a deshidratar como es el tomillo, luego se procedió a pesar la bandeja de secado vacía y luego con el tomillo, luego se colocaron las bandejas de secado dentro de la cámara de secado y se procedió al deshidratado del tomillo, para ello se seleccionaron intervalos de tiempo de 1 hora, para ir pesando cada hora las tres bandejas de secado. Se anotó cada hora el peso, la temperatura ambiente, la humedad relativa y el flujo de gas consumido por el prototipo. Con estos datos se realizaron las tablas y las curvas de secado en el programa de Excel, dando como resultado las curvas de deshidratado del tomillo.

Aplicación del modelo estadístico

Para probar la hipótesis propuesta en la introducción de este artículo, se hará uso del diseño experimental factorial y el análisis pro metodología de superficie de respuesta (MSR), para validar la significancia y los efectos de la velocidad y la temperatura sobre la humedad, para eso se tabularon los datos en una hoja electrónica de Microsoft Excel© y el análisis de datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion v15.1 (Statpoint, USA).

El cuadro 1 presenta el número de muestras requeridas para llevar a cabo el diseño experimental, donde el test estadístico a utilizar será ANOVA de efectos fijos con interacción, donde se requiere calcular el tamaño de la muestra dada una probabilidad de error α , para esto se utiliza el software G*Power Universidad Dusseldorf, Alemania [14].

Cuadro 1. Muestras requeridas para el diseño experimental. [15]

A priori: Tamaño de muestra requerida		
Entradas:	Tamaño del efecto	0,25
	α probabilidad de error	0,1
	Power (1- β err prob)	0,9
	Numerador df	1
	Número de grupos	2
Salidas:	Parámetro de no centralidad λ	8,68
	F crítico	2,74
	Denominador df	137
	Tamaño de muestra total	139
	Power real	0,901

Muestras experimentales

En Colombia, en la región de Antioquia, las muestras experimentales de Tomillo fueron suministradas por la Asociación de Productores de Plantas Aromáticas del Municipio de Cocorná (APAMCA), lugar en el cual fueron proporcionadas 285 muestras para la experimentación.

Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) o *Response Surface Methodology (RSM)* es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el desarrollo, mejoramiento y optimización de procesos. Es también importante en aplicaciones para el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos, así como también el mejoramiento de los ya existentes. Las aplicaciones más conocidas de las técnicas de RSM están en el área industrial, particularmente en situaciones donde muchas variables pueden influenciar un resultado cualitativo o cuantitativo llamado "respuesta". Las variables de entrada son conocidas como "variables independientes" y están bajo el control del técnico o investigador. La técnica se desarrolla en cuatro etapas:

1. Los factores críticos que son importantes en el estudio o proceso son identificados.
2. Se ha establecido un área o nivel de aplicación de los factores involucrados.
3. Son efectuados diseños experimentales específicos.
4. Los resultados de los diseños son analizados por RSM e interpretados.

Por lo tanto, la RSM permite:

- Mapeo de una superficie dentro de la región explorada.
- Escoger las condiciones de operación para obtener una respuesta específica.
- Buscar las condiciones óptimas, o por lo menos, las mejores condiciones en la región de interés [16-18].

Diseño Central Compuesto Rotable (DCCR)

El diseño DCCR fue propuesto por Box y Wilson (1951) como una alternativa al diseño factorial 3^k , básicamente consiste de un núcleo factorial 2^k , cuyos niveles de los

factores se codifican con +1 y -1, así como niveles que pueden variar de acuerdo al número de factores a evaluar y garantiza además, una propiedad estadística de rotabilidad. El diseño de experimentos planteado en este estudio es un diseño DCCR o factorial completo. Este diseño experimental fue esencial para realizar los ensayos, ya que permitió obtener información confiable para extraer conclusiones. La evaluación de la influencia de las variables fue realizada con un diseño de experimentos factorial completo, según se observa en el cuadro 2.

Se realizaron experimentos de secado siguiendo el diseño factorial completo con dos niveles en dos variables independientes (temperatura del aire y caudal, es decir, variable indirecta de la velocidad del aire en el lecho o ducto del secador), según se observa en el cuadro 3.

Cuadro 2. Diseño experimental factorial completo 2^2 para secado de tomillo.

Ensayo	Q*	T*	Q*	T*
	(rpm)	(°C)	(rpm)	(°C)
1	-α	0	1517,16	45
2	1	1	2000	50
3	0	-α	1800	37,93
4	0	0	1800	45
5	0	+α	1800	52,07
6	+α	0	2082,84	45
7	-1	1	1600	50
8	1	-1	2000	40
9	0	0	1800	45
10	-1	-1	1600	40

Nota: Las letras T* indica Temperatura y Q* indica Caudal.

Cuadro 3. Variables independientes y niveles utilizados en el diseño experimental factorial completo.

VI	Niveles				
	-α**	-1	0	1	+α**
T	37,93	40	45	50	52,07
Q*	1517,16	1600	1800	2000	2082,84

*Para cada rpm se calculó su respectivo valor de velocidad del aire en m/s.

**El nivel $\pm\alpha$ se calculó como: $\pm\sqrt[n]{(n * \ln 2)}$

Donde n es el número de variables o factores independientes. En este estudio el valor es de $\pm 1,41$.

Nota: La sigla VI indica variable independiente.

T=Temperatura nominal del aire (°C)

Q*=Caudal (rpm)

La determinación de los niveles de cada variable independiente fue realizada de acuerdo con las posibles condiciones del proceso, las cuales son limitadas por los equipos. El caudal del aire depende de la velocidad del motor, cuyo límite máximo es 3600 rpm.

Luego de efectuar la primera secuencia de secado de tomillo en función de los factores implicados (humedad y caudal) se procede a plantear un segundo diseño de experimentos factorial completo de tipo DCCR con el fin de observar una mejora en las condiciones de operación para el secado, en función de la humedad final del producto. La segunda secuencia o etapa de secado propuesta, se plantea al observar los elevados tiempos de secado requeridos en las condiciones que alcanzaron los valores más bajos de humedad final y según lo planteado en la norma técnica NTC 4423 [20] se indica que valores de humedad del 12% son recomendables para la comercialización de tomillo deshidratado. Por tal motivo, los experimentos siguientes son planeados bajo una estructura de un diseño DCCR, con el objeto de hallar la combinación de factores independientes, que permiten alcanzar una humedad final del 12% teniendo en cuenta menores tiempos de operación, puesto que mayores tiempos implican un gasto energético proporcional y por ende un incremento en el costo final del producto deshidratado.

El cuadro 4 presenta la segunda secuencia de experimentos planeados para el secado de tomillo en función de la temperatura y el caudal. En esta secuencia se plantea un nuevo rango de temperaturas a mayores caudales.

El cuadro 5 presenta el segundo diseño de experimentos planteado ubicando los códigos de experimentación y los respectivos niveles de los factores de estudio.

Cuadro 4. Variables independientes y niveles utilizados en el diseño experimental factorial completo.

VI	Niveles				
	-α**	-1	0	1	+α**
T	44,93	47	52	57	59,07
Q*	1817,16	1900	2100	2300	2382,84

*Para cada rpm se calculó su respectivo valor de velocidad del aire en m/s.

**El nivel $\pm\alpha$ se calculó como: $\pm\sqrt[n]{(n * \ln 2)}$

Donde n es el número de variables o factores independientes. En este estudio el valor es de $\pm 1,41$.

Nota: La sigla VI indica variable independiente.

T= Temperatura nominal del aire (°C)

Q*= Caudal (rpm)

Después de la realización de los experimentos, se obtuvieron los modelos de regresión y la tabla de Análisis de Varianza (ANOVA). A través de la tabla ANOVA, se puede verificar cuál de los modelos presentaba una mejor predicción de los resultados. A partir del modelo obtenido, se visualizó gráficamente mediante superficie de respuesta, la interacción entre las variables independientes y la dependencia de la variable de respuesta (humedad) con las variables independientes, dentro de los límites preestablecidos para el secado.

RESULTADOS

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de la variable de respuesta Humedad en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, un efecto tiene un valor-P menor que 0,1, indicando que es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 90,0%.

Se toma un valor de significancia estadística del 90% siguiendo lo propuesto por Rodrigues & Lemma (2005) donde indican que al utilizar diseños factoriales completos en el tratamiento de procesos industriales en los cuales incluyen operaciones unitarias con una amplia variación implícita, es factible asumir errores del 10% evitando con ello caer en el descarte o supresión de factores con significancia a una mayor escala.

Cuadro 5. Diseño experimental factorial completo 2² para secado de tomillo (segunda secuencia).

Ensayo	T*	Q*	T*	Q*
	(C)	(rpm)	(C)	(rpm)
1	-1	1	47	2300
2	1	-α	52	1817,16
3	+α	0	59,07	2100
4	-α	0	44,93	2100
5	-1	-1	47	1900
6	0	+α	52	2382,84
7	0	0	52	2100
8	1	-1	57	1900
9	0	0	52	2100
10	1	1	57	2300

Nota: Las letras T* indica Temperatura y Q* indica Caudal.

El cuadro 6 presenta el Análisis de Varianza (ANOVA) para la primera secuencia de diseños factoriales completos desarrollada en este estudio. En ella se observa que la temperatura posee un efecto significativo sobre la variable de respuesta humedad ($p=0,0124$).

Las figuras 1 y 2 presentan la superficie y el contorno de la respuesta para la primera secuencia de secado de

Cuadro 6. Análisis de Varianza para Humedad de tomillo.

Fuente	SS	GI	MS	Razón-F	Valor-P
Q	0,111	1	0,111	0,02	0,893
T	102,66	1	102,666	18,74	0,0124
QQ	0,560	1	0,5600	0,1	0,765
TQ	1,575	1	1,575	0,29	0,620
TT	8,239	1	8,239	1,5	0,287
Error total	21,91	4	5,479		
Total (corr.)	134,794	9			

Nota: Las letras de la fuente de variación indican Q: caudal y T: Temperatura.

Figura 1. Superficie de respuesta para humedad en función de la temperatura y el caudal en el secado de tomillo.

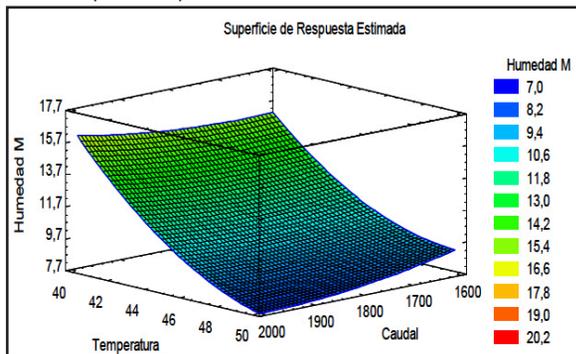
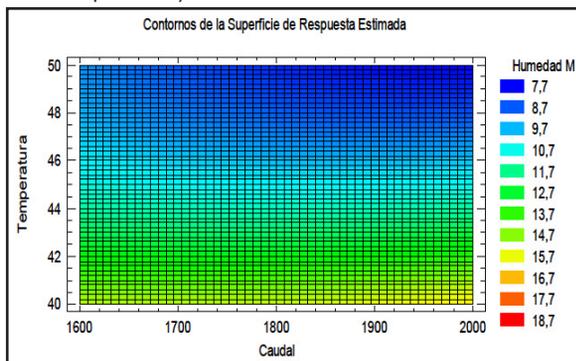


Figura 2. Contorno de la respuesta para humedad en función de la temperatura y el caudal en el secado de tomillo.



tomillo y la evaluación del efecto que la temperatura y el caudal (velocidad del aire) tienen sobre la humedad final. Los resultados indican que el mayor efecto es aportado por la temperatura del aire, aportando los menores valores de humedad entre 44 y 50°C sin dependencia del caudal, sin embargo, al evaluar los tiempos de secado para este rango de condiciones se encuentra que para obtener humedades inferiores al 10% se emplean tiempos de operación que alcanzan las 16 horas en función de bajas temperaturas y bajos caudales.

La figura 3 presenta el gráfico de probabilidad normal para la variable respuesta humedad en función de los factores o variables independientes (temperatura y caudal), en esta figura se observa que la variable independiente temperatura se aleja de forma significativa de la recta normal corroborando con ello el efecto significativo expresado anteriormente en la tabla ANOVA.

La figura 4 presenta el análisis de residuos para la humedad en función de la temperatura del aire y del caudal (velocidad del aire). Allí se observa que los datos colectados no presentan ningún rasgo de tendencia

Figura 3. Gráfico de probabilidad normal para la humedad en función de la temperatura y el caudal en el secado de tomillo.

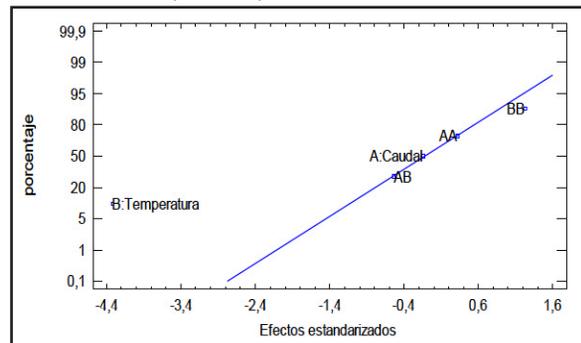
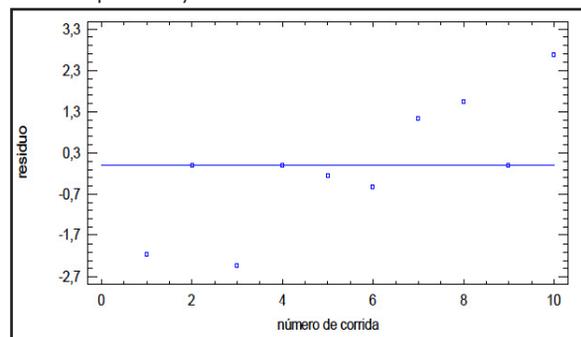


Figura 4. Gráfico de residuos para la humedad en función de la temperatura y el caudal en el secado de tomillo.



con lo cual aportan al cumplimiento del supuesto de independencia, esto se debe a que la distribución de los errores es homogénea y se debe a una aleatorización previa de los ensayos.

La ecuación 1 presenta el modelo de regresión obtenido, el cual presenta un coeficiente R² de 83,74%, con lo cual, se indica que es propicio la presentación de superficies y contornos de la respuesta, ya que el modelo explica en un porcentaje mayor al 70% la variabilidad del fenómeno aquí analizado. En la ecuación 1 se observa que existe un efecto lineal decreciente causado por los factores temperatura y caudal, sin embargo, se logra apreciar que la temperatura tiene un efecto de 4,42 veces sobre el caudal. Es decir, por cada cambio en el caudal la temperatura cambiará en 4,42 puntos. Los efectos cuadráticos no son significativos.

$$H = 129,91 - 0,004Q - 4,42T + Q^2 - 0,0005QT + 0,054T^2 \quad (\text{Ec.1})$$

Donde H: humedad; T: Temperatura y Q: Caudal.

El cuadro 7 presenta el análisis de varianza ANOVA para la variable humedad en la segunda secuencia de secados. Esta tabla presenta a la variable independiente temperatura como la más estadísticamente significativa (valor p=0,0638) a un nivel de significancia del 90% siguiendo lo propuesto por Rodrigues & Lemma (2005) para procesos industriales.

La figura 5 presenta el gráfico de Pareto estandarizado para la variable de respuesta humedad del tomillo en función de los factores experimentales temperatura del aire y caudal. En esta figura se observa como la temperatura es el factor más significativo sobre la

Cuadro 7. Análisis de Varianza para Humedad.

Fuente	SS	GI	MS	Razón-F	Valor-P
T	19,129	1	19,129	6,46	0,0638
Q	5,086	1	5,086	1,72	0,26
TT	2,550	1	2,550	0,86	0,405
TQ	11,492	1	11,492	3,88	0,120
QQ	5,792	1	5,792	1,96	0,234
Error total	11,837	4	2,959		
Total (corr.)	61,80	9			

Nota: Las letras de la fuente de variación indican Q: caudal y T: Temperatura.

humedad del tomillo, corroborando con ello lo planteado en la tabla ANOVA.

Las figuras 6 y 7 presentan la superficie y el contorno de la respuesta para la variable de respuesta humedad final del tomillo en función de los factores temperatura del aire y caudal. En ambas figuras se denota como las combinaciones de los factores revelan la

Figura 5. Gráfico de Pareto para humedad en función de la temperatura del aire y el caudal.

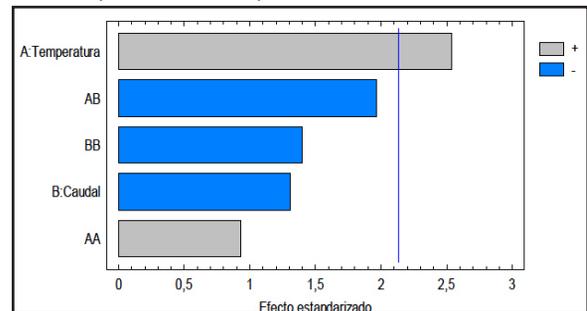


Figura 6. Superficie de respuesta para secado de tomillo en función de la temperatura del aire y del caudal.

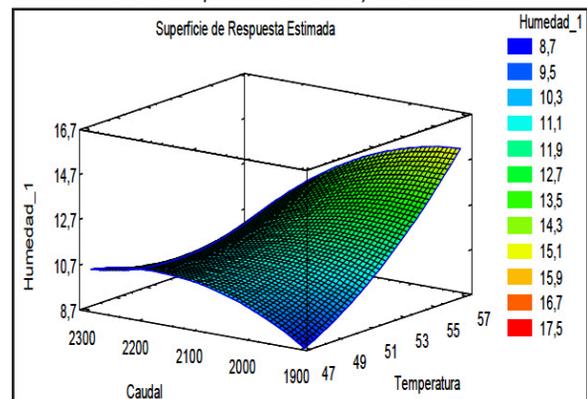
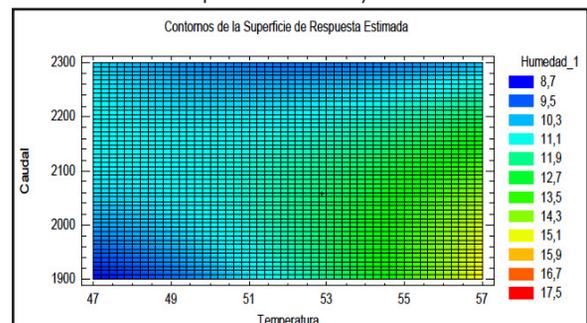


Figura 7. Contorno de la Respuesta para humedad del tomillo en función de la temperatura del aire y el caudal.



mejor condición para el secado del tomillo siguiendo lo establecido por la norma NTC 4423 [20].

La figura 8 hace referencia al mejor punto de experimentación o condición óptima de operación para obtener tomillo deshidratado a un 12% de humedad según lo expresado en la NTC 4423, el contorno aquí presentado se encuentra distribuido por regiones que resultan de las combinaciones experimentales establecidas y que permiten observar de una forma mucho más clara la mejor condición de experimentación. Bajo esta condición óptima, Zhao *et al.* (2016) afirman que ningún microorganismo puede sobrevivir cuando la cantidad de agua se encuentra debajo de 0,6, y el crecimiento de la mayoría de bacterias y hongos cuando la cantidad de agua está debajo de 0,85, así 0,6 se espera que sea el umbral para un alimento seguro y 0,12 para el cumplimiento de la norma técnica Colombiana.

La figura 9 presenta el gráfico de residuos versus el orden de corrida, en esta figura se observa que no

Figura 8. Contorno de la respuesta para la humedad del tomillo en función de la temperatura del aire y el caudal con regiones diferenciadas.

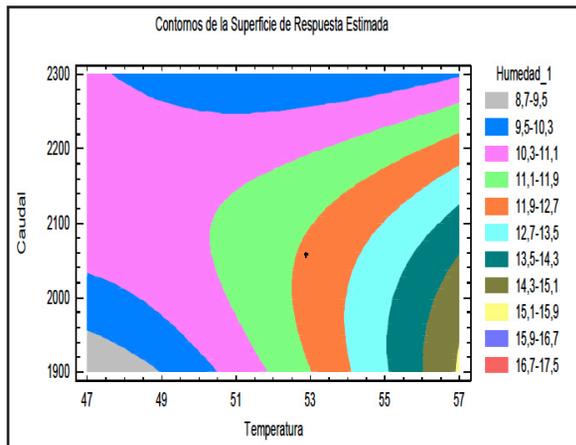
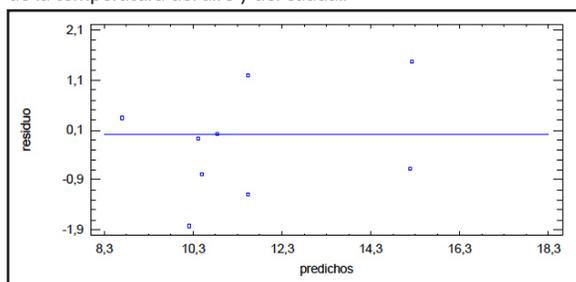


Figura 9. Gráfico de residuos para humedad del tomillo en función de la temperatura del aire y del caudal.



existe tendencia en los errores, con lo cual se puede asegurar que se cumple con el supuesto de independencia y homogeneidad en varianza, estos resultados indican que las experimentaciones fueron sometidas a un ejercicio de aleatorización.

La ecuación 2 presenta el modelo de regresión obtenido a partir de la segunda secuencia de secado, se observa que el efecto de la temperatura y el caudal crecen linealmente con un efecto aditivo de 0,56 veces, es decir, el efecto de la temperatura aumenta en 0,56 puntos por cada aumento en el caudal.

El coeficiente de regresión obtenido fue de 80,84%, indicando que gran parte de la variabilidad del fenómeno estudiado es explicado por el modelo obtenido. Este modelo puede emplearse para posteriores estudios que impliquen el secado de tomillo en las condiciones planteadas.

Siguiendo lo planteado por Rodrigues y Lemma (2005) para la aceptación de modelos de regresión con R^2 con valores mayores o iguales al 70%, se observa que en este estudio los coeficientes obtenidos están por encima del valor mínimo planteado y soportan su análisis en las respectivas superficies y contornos antes presentados y elucidados.

$$H = -224,591 + 0,762T + 0,202Q + 0,03T^2 - 0,002TQ - 0,00003Q^2 \quad (\text{Ec.2})$$

Donde H: humedad; T: Temperatura y Q: Caudal.

CONCLUSIONES

La temperatura se presenta como el factor más significativo sobre la humedad final del tomillo deshidratado con valor $p=0,0124$ con un nivel de significancia del 90%. A las condiciones de temperatura halladas se observa que el mejor caudal se ajusta a la región entre 2050 - 2100 rpm, que corresponden con la mejor región de temperaturas de 52-53°C.

Las condiciones más bajas en términos de temperatura de secado permiten obtener un producto con menor humedad final (8-12%) [19,22], sin embargo, los tiempos requeridos para alcanzar estas humedades superan las 16 horas, lo que los hace inviables

en términos de escalamiento industrial por el alto costo energético que implican.

Los resultados obtenidos en este estudio donde se evalúa el efecto de la temperatura del aire y el caudal sobre la humedad final del tomillo deshidratado indican que se puede obtener un producto que cumple los estándares de calidad exigidos en la normatividad, razones que permiten que pueda ser comercializado o introducido en la cadena de valor de especias y condimentos de la industria de alimentos.

El tomillo deshidratado en las condiciones óptimas alcanza una humedad final del 12% cumpliendo lo establecido en la norma técnica NTC 4423 y siguiendo un planteamiento experimental basado en un DCCR con factores y niveles establecidos para un secador de fabricación nacional.

REFERENCIAS

- [1] ALARCÓN, R. *et al.* Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 2015, p. 207–224, doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.022
- [2] STAHL-BISKUP, E. and VENSKUTONIS, R.P. En: *Handbook of herbs and spices. Thyme*. 2 ed. New York (USA): Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2012, p. 499–525.
- [3] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Estadísticas agrícolas [online]. 2017. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>. 2017 [consulta 03102017].
- [4] GOMES, T.R. *et al.* Dehydrated cashew apple meal in the feeding of growing rabbits. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(2), 2018, p. 757-770.
- [5] BRADFORD, K.J. *et al.* The dry chain: Reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates. *Trends in Food Science and Technology*, 71(2), 2018, p. 84–93.
- [6] CIURZYŃSKA, A., KOWALSKA, H., CZAJKOWSKA, K. and LENART, A. Osmotic dehydration in production of sustainable and healthy food. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 2016, p. 186–192.
- [7] SALIM, N.S., KURIAN, J.K., GARIEPY, Y. and RAGHAVAN, V. Application and the Techno-Economical Aspects of Integrated Microwave Drying Systems for Development of Dehydrated Food Products. *Japan Journal of Food Engineering*, 17(2), 2016, p. 7–10.
- [8] RODRIGUEZ, J., MELO, E.C., MULET, A. and BON, J. Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts: Management of the convective drying process assisted by power ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 2013, p. 793–799, DOI.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.016
- [9] VELASQUEZ, C. Development of a technology for drying oregano type export using propane gas as fuel [MSc. Thesis Energy Management]. Medellín (Colombia): Metropolitan Technological Institute, Faculty Engineering, 2012, 128 p.
- [10] MORAIS, R.M.S.C. *et al.* Functional Dehydrated Foods for Health Preservation. *Journal of Food Quality*, 1, 2018, p. 1-29, DOI: 10.1155/2018/1739636.
- [11] REIS, M.S., MARIOT, A. and STEENBOCK, W. En: *Farmacognosia: da planta ao medicamento. Diversidade e domesticação de plantas medicinais*. 5 ed. Porto Alegre (Brasil): UFRGS, 2003, p. 43–74.
- [12] BROOKER, D.B., BAKER-ARKEMA, F.W. and HALL, C.W. *Drying and storage of grains and oilseeds*. New York (USA): Springer US, 1992.
- [13] DOYMAZ, I. Drying of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and selection of a suitable thin-layer drying model. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1, 2010, p. 1–8, DOI.org/10.1111/j.1745-4549.2010.00488.x
- [14] ERDFELDER, E., FAUL, F., BUCHNER, A. and LANG, A.G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41(4), 2009, p. 1149–1160, DOI.org/10.3758/BRM.41.4.1149
- [15] FAUL, F., ERDFELDER, E., LANG, A.G. and BUCHNER, A.G. Power: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 2007, p. 175–191, DOI.org/10.3758/BF03193146
- [16] BARROS, B., SPACINO, I. e BRUNS, R. *Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 3 ed. Campinas (Brasil): Unicamp, 2001, 480 p.
- [17] MYERS, R., MONTGOMERY, D. and ANDERSON-COOK, C.M. *Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiment*. 4 ed. New Jersey (USA): Wiley-Interscience Publication, 2016, 856 p.

- [18] RODRIGUES, M. e LEMMA, A. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1 ed. Campinas (Brasil): Casa do Pão, 2005, 325 p.
- [19] BOX, G.E.P. and WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimal conditions. Journal of the Royal Statistical Society, series B, 13(1), 1951, p. 1-45,
- [20] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (ICONTEC). Industria Alimentaria, Especies y Condimentos (No. NTC 4423). Bogotá (Colombia): 1998.
- [21] ZHAO, X. *et al.* Drying temperature affect the quality of dehydrated mint. Huangshan (China): Proceedings 2015 7th International Conference on Information Technology in Medicine and Education. (ITME), 2016, p. 456-459.
- [22] DA ROCHA, R et al. Cinética del secado de tomillo. Revista Brasileira de ingeniería agrícola y ambiental, 16(6), 2012, p. 675-683.

Frecuencia de corte de pasto elefante morado *Pennisetum purpureum* Schumach

Cutting frequency of purple elephant grass *Pennisetum purpureum* Schumach

Frequência de corte capim napier *Pennisetum purpureum* Schumach

NELSON JOSÉ VIVAS-QUILA¹, MILVIA ZULEIDA CRIOLLO-DORADO²,
MARÍA CAMILA CEDEÑO-GÓMEZ²

RESUMEN

*Para definir condiciones de manejo de forrajes de corte para el trópico y verificar la capacidad de recuperación de elefante morado (*Pennisetum purpureum*), se evaluó la frecuencia de corte en Popayán - Colombia, a 1780 msnm, en bosque húmedo premontano bajo (bh-PM). Para el momento óptimo del corte, se evaluaron a diferentes edades de rebrote las variables vigor, altura de planta, producción de forraje verde, porcentaje de materia seca e incidencia de plagas y enfermedades, se consideró la calidad nutricional, análisis de costos y se realizó la curva de crecimiento; bajo un diseño experimental de bloques completos al azar, con 5 tratamientos y 4 repeticiones, se delimitaron 20 parcelas experimentales de 9 m², el factor bloqueado fue pendiente del terreno como presunción de variaciones de fertilidad del suelo. Cada tratamiento correspondió a una edad diferente de rebrote al momento del*

Recibido para evaluación: 1 de Mayo de 2017.

Aprobado para publicación: 10 de Marzo de 2018.

- 1 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Nutrición Agropecuaria. Profesor Titular, Doctor en Ciencias Agrarias. Popayán, Colombia.
- 2 Ingeniera agropecuaria, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

Correspondencia: nvivas@unicauca.edu.co

corte, evaluando a 50, 60, 70, 80 y 90 días de rebrote, (T1, T2, T3, T4, y T5 respectivamente). Se hicieron evaluó en dos épocas diferentes (Lluvias y seca). Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva, análisis de varianza ($P=0,05$) y prueba de Duncan (SPSS V 15). Se concluyó que el momento óptimo de corte del pasto elefante morado es a los 70 días con una producción de 25,4 ton/Ms/ha/año y proteína del 8%.

SUMMARY

In order to define the conditions of management of cuttings for the tropics and to verify the recoverability of the purple elephant (*Pennisetum purpureum*), the cutting frequency was evaluated in Popayan - Colombia, at 1780 masl, in low premontane humid forest (bh -PM). At the optimum cutting time, different ages of sprouts were evaluated for variables: vigor, plant height, green forage production, dry matter and incidence of pests and diseases, the nutritional quality, cost analysis and the growth curve was performed for the mentioned species, a randomized complete block experimental design, with 5 treatments and 4 replicates, was used, 20 experimental plots of 9 m² were delimited, where the factor blocked Was the slope of the land as a presumption of variations in soil fertility through it. Each treatment corresponded to a different age of regrowth at the time of the cut, evaluating at 50, 60, 70, 80 and 90 days of regrowth, corresponding to treatments T1, T2, T3, T4, and T5 respectively. They were evaluated in two different seasons (Rain and dry). The results were analyzed using descriptive statistics, analysis of variance ($P=0,05$) and Duncan's test (SPSS V 15). It was concluded that the optimum cutting time of purple elephant grass is 70 days with a yield of 25,4 ton/Ms/ha/ year and 8% protein.

RESUMO

Para definir as condições de condução forragem colhida para as regiões tropicais e verificar a capacidade de resistência roxo (*Pennisetum purpureum*), a frequência de corte em Popayán avaliadas - Colômbia, 1780 m, em baixo floresta premontane (BH-PM). Para tempo ideal de corte, foram avaliados em diferentes idades de rebrota as variáveis de força, altura da planta, produção de forragem verde, a percentagem de matéria seca e incidência de pragas e doenças, qualidade nutricional foi considerado análise, custo e executada a curva de crescimento; sob delineamento experimental de blocos aleatórios completos com 4 repetições e 5 tratamentos, 20 parcelas experimentais de 9 m² é delimitado, o factor foi bloqueada terrenos inclinados como presunção de variações de fertilidade do solo. Cada tratamento correspondeu a um intervalo de corte diferente no momento do corte, a avaliação das 50, 60, 70, 80 e 90 dias recrescimento, (T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente). Eles não avaliada em dois tempos diferentes (molhado e seco). Os resultados foram analisados usando a estatística descritiva, a análise de variância ($P=0,05$) e o teste de Duncan (SPSS V 15). Concluiu-se que o tempo ideal para a grama do corte é elefante roxo 70 dias, com produção de 25,4 ton/Ms/ha/ ano e 8% de proteína Ms.

PALABRAS CLAVE:

Corte óptimo, Calidad nutricional, Producción forraje.

KEYWORDS:

Optimus cut, Nutritional quality, Forage production.

PALAVRAS-CHAVE:

Corte ideal, Qualidade nutricional, A produção de forragem.

INTRODUCCIÓN

En los países en desarrollo del trópico, se produce la mayor parte de la carne y la leche del mundo en desarrollo y casi la mitad de los sistemas son mixtos de cultivo y ganadería [1,2]. Plantear mejoras del rendimiento de los cultivos y animales es esencial para la intensificación sostenible y contribuir a la mitigación del impacto medioambiental derivado de la intensificación [3,4]. Los sistemas tropicales de producción pecuaria se basan en forrajes [5], bajo este marco, se habla hoy de "Livestock plus" [6, 7], como concepto de manejo ecoeficiente de la ganadería y es en este campo que la eficiencia en sistemas de producción de forraje para corte y acarreo cobra vital importancia.

La ganadería Bovina en el Departamento del Cauca participa con el 50% del Producto Interno Bruto (PIB) regional y ocupa más del 50% de la población económicamente activa, que genera aproximadamente el 13,5% del PIB nacional. Del total del producto agropecuario, aproximadamente el 30% se origina en el sector pecuario, donde la ganadería bovina de carne y leche constituye el 90% de este sector, motor del desarrollo socioeconómico del departamento, pero objeto de constantes críticas, puesto que se basa en sistemas ganaderos extensivos, que han deteriorado los recursos naturales (suelo, aguas, fauna y flora) [8].

Los suelos de la formación Popayán, "proviene de materiales de origen volcánico (Andisoles) y de la meteorización de los diferentes tipos de rocas de acuerdo a su formación geológica (rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias). En general son suelos recientes y jóvenes (Entisoles e Inseptisoles). En una menor proporción se presentan los suelos formados a partir de materiales orgánicos clasificados en el orden taxonómico de los Histosoles" [9,10].

Es clima templado húmedo con relieve fuertemente ondulado con pendientes hasta del 25%; los suelos son muy profundos a muy superficiales, fuertemente ácidos y baja fertilidad [11,6].

En cuanto mayor sea la base forrajera disponible (cantidad de alimento total producido) mayor será la carga animal del predio en uso ganadero. Es por eso que se hace notorio un creciente interés y al mismo tiempo una alta demanda por el cultivo de forrajes para corte y acarreo, los cuales tienen la capacidad de producir mayor cantidad de biomasa por unidad

de área [12]. Esto implica minimizar el desperdicio de forraje eliminando el pisoteo, evitando el gasto de energía durante el pastoreo y disminuyendo la selección del animal que normalmente deja un residuo considerable en los potreros [13, 14].

En la investigación con pasto elefante morado o camerun (*Pennisetum purpureum* Schumach) [15], se evaluó la producción de forraje verde a los 50, 60, 70, 80 y 90 días de rebrote y valorar su calidad nutricional en términos de proteína cruda (PC), fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y la digestibilidad "in vitro" de la materia seca (DIVMS); definir el momento óptimo de corte y elaborar su curva de crecimiento y producción bajo condiciones de manejo en el peniplano de Popayán; Se determinó el momento óptimo de cosecha respecto a la producción y calidad forrajera.

MÉTODO

Para el desarrollo de la investigación se trabajó bajo la norma de la Red Internacional de Evaluación de Forrajes Tropicales RIEPT descrita por Toledo (1982), la cual se detalla a continuación [16].

Área de estudio

El trabajo se realizó en el municipio de Popayán, bosque húmedo premontano bajo (bh-PM); localización geográfica N 20° 30.6' 58" - W 76° 33.6' 06", a una altura 1800 m.s.n.m., temperatura media de 18°C.

Material experimental

Para la realización de este trabajo, se dispuso de un lote con elefante morado *Pennisetum purpureum* Schumach, con aproximadamente un año y medio de establecimiento, sembrado a una distancia de 50 cm entre surcos. El riego se realizó por aspersión hasta obtener su capacidad de campo.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, con 5 tratamientos y 4 bloques (repeticiones). Cada parcela de 3 X 3 m para un área de 9 m² sembradas de manera contigua con surcos cada 0,5 m, para un área total del lote de 180 m². El factor a bloquear fue la pendiente del terreno, como una presunción de

variaciones de fertilidad del suelo a través del mismo; en cada bloque se distribuyeron y enumeraron los tratamientos al azar. Para eliminar el efecto de bordes, se dejó un metro alrededor del área experimental.

Modelo estadístico

Se tomó toda la parcela para hacer las evaluaciones de cada repetición en los tratamientos, los cuales fueron: 50, 60, 70, 80 y 90 días de rebrote, lo que correspondió a los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 respectivamente. Se evaluó en dos épocas; seca y lluvias. Es importante anotar que en la época seca se regó en correspondencia al manejo técnico que se le da a este cultivo en la finca. El modelo estadístico correspondió a la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

Y_{ij}: Variable respuesta de tratamientos con j repeticiones.

u: Efecto de la media general.

T_i: Efecto de los tratamientos.

B_j: Efecto del bloque.

E_{ij}: Efecto del error experimental.

VARIABLES EVALUADAS

Se empleó la metodología de Red Internacional de Evaluación de Pastos tropicales [17]. Las variables evaluadas fueron:

Vigor. Expresado por el estado de la planta, color, crecimiento y sanidad en una escala de 1 a 5, siendo 1 el peor y 5 el mejor. El patrón de comparación fue todo el ensayo [12].

Altura de plantas. Medida como la distancia desde el piso hasta la parte más alta de las plantas en su estado natural, medida en centímetros [17]. Se tomó la altura promedio de tres plantas por parcela.

Cobertura. Se observó la cantidad de forraje en cada parcela y se calificó en porcentaje (100%).

Producción de forraje verde. Para esta evaluación se registró el peso de una muestra por metro cuadrado, mediante el método gravimétrico se registró la producción de forraje verde.

Producción de materia seca (MS). Para la obtención de la MS, se tomó de cada parcela una submuestra de forraje verde por cada tratamiento, de aproximadamente 200 gr previamente picada y luego empacada en una bolsa de papel, esta fue puesta en un horno de ventilación controlada a 70°C por 72 horas y luego se pesó, para por diferencias de pesos obtener el porcentaje de materia seca de la muestra.

Presencia de plagas. Para la evaluación la incidencia y severidad causada por insectos comedores de follaje, la evaluación del daño se hizo en una escala de 1 a 4, así [17]:

1. Presencia de algunos insectos: la parcela no presenta área foliares consumidas.
2. Daño leve: se observa en la parcela de 1 a 10% del follaje consumido.
3. Daño moderado: el consumo del follaje en la parcela es del 11 al 20 %.
4. Ataque grave: más del 20 % del follaje de la parcela ha sido consumido por el insecto.

Presencia de enfermedades. Se procedió a recorrer las parcelas, se consideran plantas afectadas las que presentan síntomas de enfermedades y se califican de 1 a 4 así [17]:

1. Presencia de la enfermedad: 5% de plantas afectadas.
2. Daño leve: 5-20% de plantas afectadas.
3. Daño moderado: 20-40% de plantas afectadas.
4. Daño severo o grave: más de 40% de plantas afectadas.

Calidad nutricional. Para la caracterización nutricional se tomaron muestras de forraje verde previamente picadas, de 1 Kg en el segundo corte de cada parcela (una por tratamiento), las cuales se enviaron al laboratorio de análisis de calidad de alimentos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se evaluó su contenido de Proteína cruda (PC), digestibilidad "in

vitro” de la materia seca (DIVMS). Fibra en detergente neutro (FDN) y Fibra en detergente ácido (FDA).

Curva de crecimiento. Se realizaron evaluaciones cada 7 días, de la altura de las plantas, producción de biomasa fresca total y contenido de materia seca. Para la medición de la altura del pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach), se realizó un corte de estandarización y a partir de ese momento se midieron de forma semanal hasta llegar a los 90 días de rebrote.

Corte de uniformidad. El corte se realizó a ras del suelo con el propósito de de homogenizar el ensayo [17].

Cosecha. Se realizaron 3 cortes (uno de uniformidad y 2 de evaluación) por cada tratamiento.

RESULTADOS

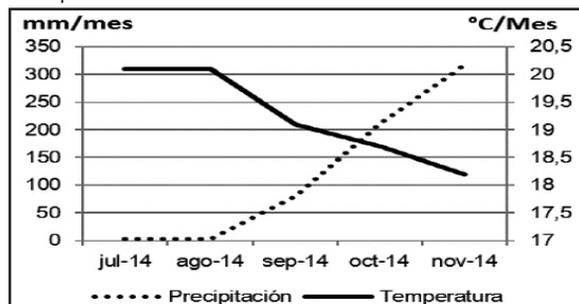
Condiciones climáticas

La investigación se vio influenciada por el comportamiento ambiental propio del peniplano de Popayán; donde las precipitaciones fueron bajas durante los meses de Julio y Agosto con lluvias entre 3 y 6 mm/mes y con precipitaciones extremas entre 210,22 y 316,85 mm/mes correspondientes a los meses de Octubre y Noviembre del año 2014 [18].

Durante la investigación se presentaron temperaturas de 18,2 a 20,1°C, propias de la zona de estudio [19,18].

Según los resultados obtenidos con el análisis de suelo, se cuenta con un pH de 6,05, con una capacidad de intercambio catiónico de 38,95 cmol/kg, su textura es franca y tiene un contenido de materia orgánica de 133,25 g/kg.

Figura 1. Comportamiento de la precipitación y temperatura en el periodo de estudio.



Análisis de las variables

Los resultados del análisis de varianza no arrojaron diferencias estadísticas (P=0,05) para ninguna de las variables evaluadas respecto al efecto de bloques, por lo tanto es factible afirmar que las condiciones del suelo y la pendiente no afectaron el desempeño productivo del pasto durante la fase evaluada.

Producción de forraje verde en materia seca

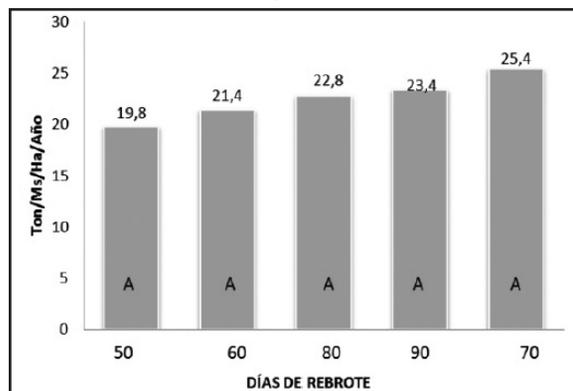
Se realizó análisis de varianza, tanto para el efecto de bloques, como el de la época de corte y los tratamientos evaluados, en el cuadro 1 se presentan el promedio en ton/Ms/ha/año por tratamiento y por época.

Entre los diferentes tratamientos (50, 60,70,80 y 90 días de rebrote) durante la fase de estudio (época seca con riego y época de lluvias) no se presentaron diferencias estadísticas (P=0,05) para la producción de materia seca (ton/ha/año), no obstante se puede apreciar que a los 70 días, la producción fue mayor, alcanzando 25,4 ton/Ms/ha/año, 2,1, 2,6,4 y 5,6. toneladas más que el corte a los 90, 80, 60 y 50 días respectivamente (Figura 2), resultados similares a los reportados para la región [20].

Cuadro 1. Producción promedio de elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach) en dos épocas de rebrote y 5 edades de rebrote ton/Ms/ha/año.

Edad rebrote	Época seca	Época lluvias	Promedio total
50 días	22	17,7	19,8
60 días	21,2	21,7	21,4
70 días	23,5	27,4	25,5
80 días	21,9	23,7	22,8
90 días	20,1	26,6	23,3

Figura 2. Producción de forraje de *Pennisetum purpureum* Schumach (ton/Ms/Ha/Año) por tratamientos.



Respecto a las épocas de rebrote, la producción general de *Pennisetum purpureum* Schumach, no presentó diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre la época seca con riego y la época de lluvias, no obstante, en lluvias se alcanzó una producción media de 23 ton/Ms/ha/año, 1,7 toneladas más que cuando la fuente de agua fue solo riego 4 horas una vez por semana.

Para la producción de forraje verde en materia seca en la época de baja precipitación, no existieron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los tratamientos, se puede apreciar como a los 70 días de rebrote, se observó la mayor producción (23,5 ton/Ms/ha/año) y a los 90 días se expresó la menor producción 20,1 ton/Ms/ha/año (Figura 3).

En la época de lluvias, aunque tampoco se presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$), al realizar una prueba de rangos múltiples de Duncan se observaron dos agrupamientos, el primero conformado por los cortes a los 50, 60 y 80 días y el segundo con los cortes a los 60, 80, 90 y 70 días. La mayor producción se alcanzó a los 70 días con 27,4 ton/Ms/ha/año, mientras que a los 90, 80, 60 y 50 días se alcanzaron producciones de (26,6, 23,7, 21,7 y 17,7 ton/Ms/ha/año respectivamente) (Figura 4).

Vigor

Durante las evaluaciones se encontraron diferencias estadísticas ($P=0,05$) respecto al vigor, por lo cual se realizó una prueba de rangos múltiples de Duncan, la cual mostró 2 grupos, lo que indica que entre el tratamiento a los 50 y los tratamientos 70, 80 y 90 días de corte hay diferencias, se apreció que el tratamiento con mayor vigor fue a los 90 días de corte con un valor de 4,6, y el menor vigor a los 50 días con un valor de 3,6.

En la evaluación de las épocas de rebrote no se observaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre la época seca con riego y la época de lluvias, sin embargo en época de lluvia se presentó un vigor de 4,2 el cual superaba la época seca con riego que tuvo un vigor de 4, 2.

Respecto a los tratamientos en la época de baja precipitación, no existieron diferencias estadísticas ($P=0,05$), pero se puede apreciar a los 90 días de rebrote se obtuvo el mayor vigor con una media de 4,50 y a los 50 y 60 días se evidenció el menor vigor con una media de 4.

Figura 3. Producción de forraje de *Pennisetum purpureum* Schumach (ton/Ms/Ha/año) en época de baja precipitación.

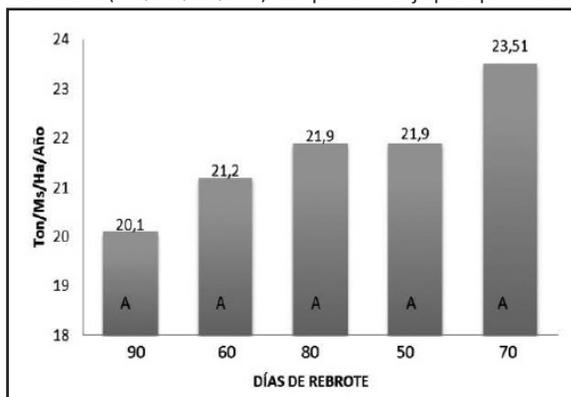
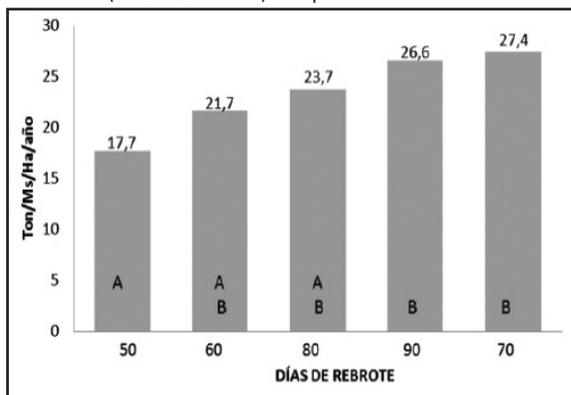


Figura 4. Producción de forraje de *Pennisetum purpureum* Schumach (ton/Ms/Ha/año) en época de lluvias.



En época de lluvias se presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) y se realizó una prueba de rangos múltiples de Duncan en el cual se observaron dos agrupamientos, el primero conformado por T1 y el segundo con los tratamientos 2,3, 4 y 5, en donde la mayor producción se alcanzó a los 90 días con un valor de 5, siendo el de menor valor el T1 con 3,5.

Altura

En el análisis se observó que durante todo el ensayo, entre los tratamientos se presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) para la variable altura, por lo que se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan en el que se evidenciaron 4 grupos de los cuales se afirma que no hay una diferencia en la altura cuando pasaban 10 días entre los cortes pero si se evidenció cuando la diferencia entre cortes fue de 20 días, observando como es lógico, que a los 90 días alcanza la mayor altura con 2,19 m y los 50 días la menor altura con 1,50 m.

En relación a las épocas de rebrote en el análisis de varianza se presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) en donde el comportamiento en época de lluvia fue mejor que la época seca con riego, alcanzando una altura promedio de 2 m superando la época seca con un promedio de 1,6 m respectivamente de lluvia y riego.

En la época de baja precipitación, se observaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los tratamientos, por consiguiente se realizaron las pruebas de rangos múltiples de Duncan, en el cual se aprecian 4 subconjuntos en donde el T5 es superior con un valor de 2,1 m, respecto a T1, T2, T3 y T4. En época de lluvia no se encontraron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los tratamientos.

Cobertura

No se presentaron entre los tratamientos diferencias estadísticas ($p=0,05$) para la variable cobertura.

Respecto a época, *Pennisetum purpureum* Schumach, se diferenció estadísticamente ($P=0,05$) entre época con riego y época de lluvias, en época de lluvias se logró una cobertura media del 83%, siendo 12% mayor que en época seca.

No se presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los tratamientos, se observó que en el corte a los 60 días se logró el mayor porcentaje de cobertura (75%) y a los 50 días el menor con un (65%).

En época de lluvias se presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) en la cobertura, por lo tanto, se realizó la prueba de Duncan, donde se apreciaron 3 subconjuntos conformados así: el primero 50, segundo 60, 80 y 90 días, finalmente el tercero 60, 70 y 90 días, el mejor porcentaje de cobertura se alcanzó a los 70 días de rebrote con un 90% mientras que el menor fue a los 50 días con un 72%.

Materia seca (MS)

En cuanto a los tratamientos, no hubo diferencias estadísticas ($P=0,05$) para MS [13], sin embargo, se observó que el mayor contenido en porcentaje de materia seca (MS) es a los 70 días (17,%) y a los 60, 90, y 80 días se presentó un contenido de MS de 15,9, 15,1 y 15% respectivamente (Figura 5).

Respecto a las épocas de rebrote, en la MS en *Pennisetum purpureum* Schumach, presentaron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre la época seca y la época de lluvias, en época seca se obtuvo un 20% y en lluvias se alcanzó un 11, 24%.

En la época de baja precipitación se encontraron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los tratamientos al realizar la prueba Duncan se observan dos subconjuntos el primero conformado por los rebrotes a los 50, 90, 80 y 60 días y el segundo por los cortes a los 60 y 70 días. El mayor porcentaje de MS se alcanzó a los 70 días con 22,9%, mientras que a los 60,80, 90 y 50 días se lograron porcentajes de 20,3, 19,6, 19 y 18,2% respectivamente (Figura 6).

Figura 5. Contenido de Materia Seca en porcentaje del pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach) en los diferentes tratamientos.

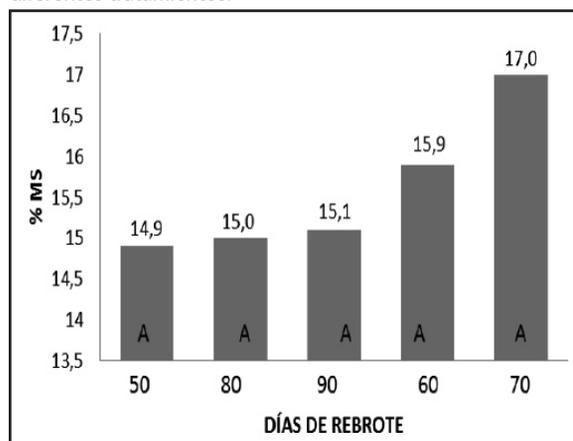
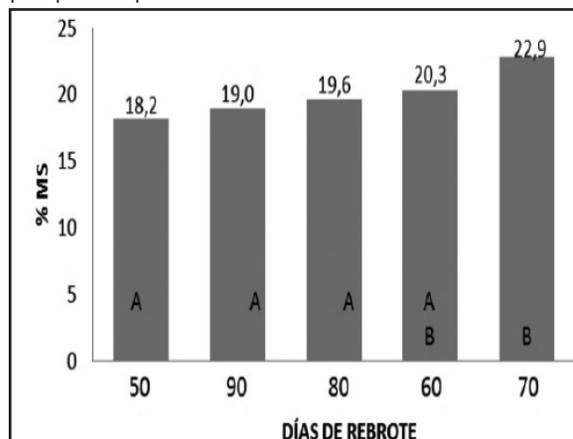


Figura 6. Porcentaje de M.S en pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach) en época de baja precipitación para los diferentes tratamientos.



En tanto en época de lluvias no se encontraron diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los tratamientos, se puede apreciar que el mayor porcentaje de MS fue en el corte a los 50 días con 11,7% y el menor a los 80 días con un 10,4% (Figura 7).

Presencia de plagas y enfermedades

La incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo de *Pennisetum purpureum* Schumach fue 1 para cada caso según la metodología propuesta [17], se observaron algunas plagas como masticadores los cuales no causaron daños significativos a la planta y no fue un factor de influencia en la toma de datos durante el desarrollo de la investigación.

Las posibles plagas que pueden afectar al *Pennisetum purpureum* Schumach es el gusano falso medidor (*Mocis spp*) y la mosca pinta o salivazo (*Zulia spp*, *Ae-*

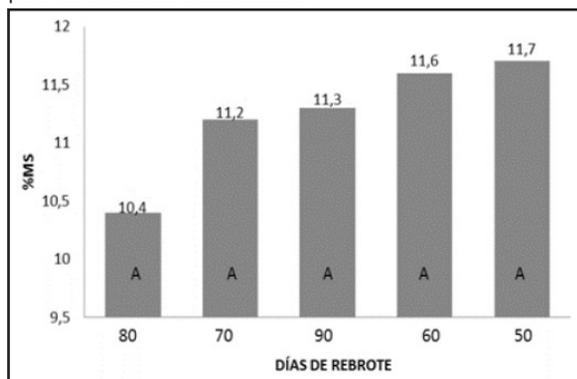
nolema spp), por lo que es necesario vigilar el desarrollo de la planta durante la época de lluvias.

Análisis bromatológico

Para la caracterización nutricional de *Pennisetum purpureum* Schumach a diferentes edades de rebrote, se realizaron análisis bromatológicos con los siguientes resultados (Cuadro 2), referenciados en la calidad nutricional reportada [21].

Como se aprecia en el cuadro 2, a los 50 días de rebrote el forraje es más nutritivo, y menos a los 90 días de rebrote; al calcular la producción de nutrientes por ha/año, combinando los resultados del laboratorio con la producción de forraje verde en materia seca obtenida en promedio por tratamiento al año (Cuadro 2 y figura 2), se puede apreciar que a los 70 días la producción total de proteína cruda por unidad de área es ligeramente mayor, alcanzando 0,12 y 0,16 ton de PC más por hectárea que a los 80 y 60

Figura 7. Porcentaje de MS en pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach) en época de lluvias para los diferentes tratamientos.

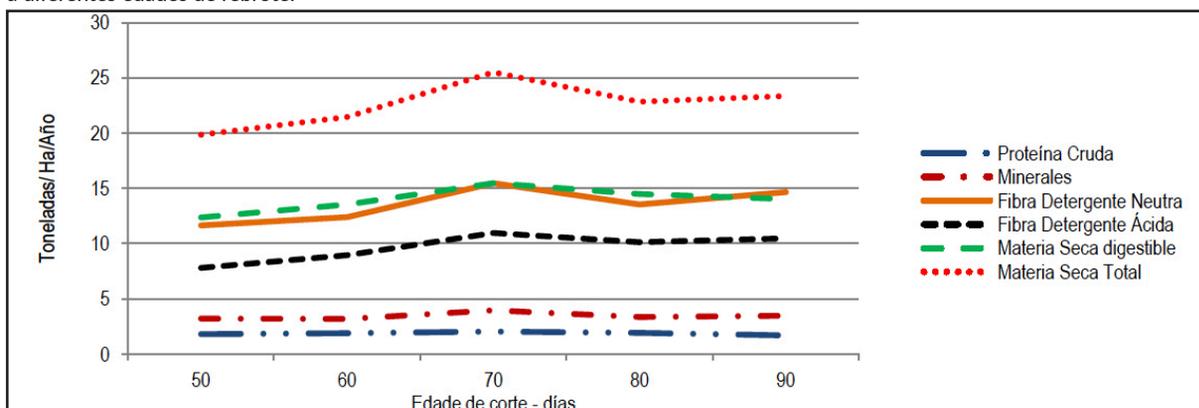


Cuadro 2. Composición nutricional del *Pennisetum purpureum* Schumach a diferentes edades de rebrote.

Ítem	Edad de Rebrote (días)				
	50	60	70	80	90
PC %	9,1	8,8	8,0	8,4	7,2
CEN %	16,2	14,7	15,5	14,7	14,8
FDN %	58,7	57,8	60,6	59,3	62,8
FDA %	39,3	41,7	43,0	44,3	44,9
DIVMS %	62,2	63,1	60,7	63,5	60,1

PC = proteína cruda, CEN= cenizas, FDN= fibra en detergente neutro, FDA= fibra en detergente ácido, DIVMS = Digestibilidad in vitro de la materia seca.

Figura 8. Producción de forraje y nutrientes del pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach) a diferentes edades de rebrote.



días respectivamente 0,22 ton más que a los 50 y 0,35 ton más que a los 90 días de rebrote (Cuadro 3).

Curva de crecimiento del pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schumach)

La curva de crecimiento para *Pennisetum purpureum* Schumach (figura 9), obedece a una curva polinómica ($R^2= 0,9351$). Este modelo presentó los mejores resultados y mostró los mayores valores de R^2 y elevada significación del modelo completo ($P < 0,001$) y sus parámetros ($P < 0,05$, $P < 0,001$). Por ello, se consideró que es el de mejor bondad de ajuste, teniendo en cuenta su forma sigmoideal, que guarda una relación lógica con el crecimiento de las plantas.

En la figura anterior, se observa el crecimiento del forraje desde el corte de estandarización hasta los 90 días. El 93% de la variación presentada corresponde a la forma de obtención de las variables, lo que hace confiable la curva aquí presentada. Su comporta-

miento se caracterizó por un rápido crecimiento desde las primeras edades, aunque fue muy homogéneo y constante hasta los 42 días de edad del forraje con resultados desde 20,6 hasta 45,6 cm y tiene una fase de crecimiento rápida después de los 42 días llegando a los 90 días con una altura de 227,9 cm. Así mismo, este comportamiento coincide con los reportes bibliográficos al respecto tanto para pasto elefante como para otras especies [20, 22, 23].

CONCLUSIONES

La producción de forraje verde de *Pennisetum purpureum* Schumach fue superior a los 70 días de rebrote, tanto en época de lluvia como en época seca, alcanzando en promedio 25,5 ton/Ms/ha/año.

En cuanto a la proteína cruda, aumento progresivamente hasta los 80 días (8,4%) disminuyendo notablemente a los 90 días (7,24%) correspondiendo con la baja de proteína en el follaje al inicio de la floración (80 – 90 días)

El crecimiento del pasto Elefante morado hasta los 90 días de rebrote corresponde a una curva polinómica, en donde se aprecia una relación directa ($R^2 = 0,93$) entre la altura y la edad de rebrote.

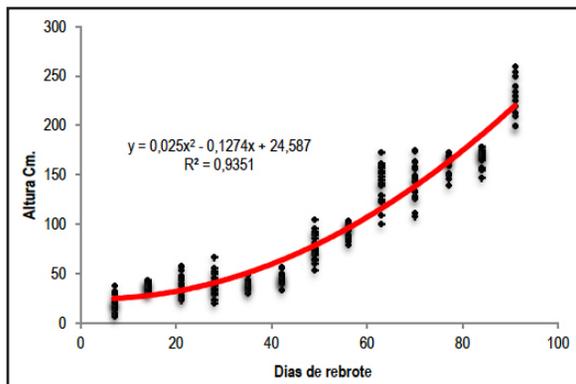
Teniendo en cuenta la calidad nutricional, la frecuencia de corte y la producción anual en MS del pasto Elefante morado *Pennisetum purpureum*, el punto óptimo de corte entre los 5 tratamientos evaluados es a los 70 días, pues en este momento del cultivo, se alcanza la mayor producción de forraje verde con una producción de 25,4 ton/Ms/Ha/Año, una proteína del 8% y de nutrientes por unidad de área.

Cuadro 3. Producción de nutrientes de *Pennisetum purpureum* Schumach a diferentes edades de rebrote (ton/ha/año).

Ítem	Edad de rebrote días				
	50	60	70	80	90
PC%	1,81	1,88	2,04	1,92	1,69
CEN %	3,22	3,17	3,94	3,36	3,47
FDN %	11,64	12,39	15,45	13,54	14,66
FDA %	7,79	8,94	10,94	10,12	10,48
DIVMS %	12,35	13,53	15,46	14,49	14,03

PC = proteína cruda, CEN= cenizas, FDN= fibra en detergente neutro, FDA= fibra en detergente ácido, DIVMS = Digestibilidad in vitro de la materia seca.

Figura 9. Curva de crecimiento de *Pennisetum purpureum* Schumach hasta los 90 días.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Cauca y al Grupo de Investigación nutrición agropecuaria Facultad de Ciencias Agrarias, por la orientación y apoyo. A la “Granja Integral Mamá Lombriz” por permitir realizar la investigación.

REFERENCIAS

- [1] RAO, I.M., PETERS, M., CASTRO, A., SCHULTZE-KRAFT, R., WHITE, D., FISHER, M. and TAPASCO, J. Livestock Plus: the sustainable intensification of forage-based agricultural systems to improve livelihoods and ecosystem services in the tropics. CIAT Publication, 407, 2015, 40 p.
- [2] OVANDO, A.L., RODRIGUEZ, A., ARCE, L. y CARDENAS, A. Características generales y uso de *Leucaena leucocephala* en la ganadería [Tesis Ingeniero Agrónomo Zootecnista]. Buenavista (México): Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División Ciencia Animal, Departamento Recursos Naturales Renovables, 2016.
- [3] LEMAIRE, G., FRANZLUEBBERS, A., CARVALHO, P.C.F. and DEDIEU, B. Integrated crop-livestock systems: Strategies to achieve synergy between agricultural production and environmental quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 190, 2014, p. 4-8, DOI: 10.1016/j.agee.2013.08.009
- [4] VIVAS, N.J. Caupí (*Vigna unguiculata*) y Canavalia (*canavalia brasiliensis*) como materias primas no convencionales en alimentación de pollos de engorde [Doctoral dissertation]. Palmira (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad Ciencias Agrarias, 2014.
- [5] PETERS, M. *et al.* Tropical forage-based systems to mitigate greenhouse gas emissions. En: Hershey, CH and Neate, P, eds. *Eco-efficiency: From vision to reality*. Cali (Colombia): International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2013 a., p. 171-190.
- [6] MORALES-VELASCO, S., VIVAS-QUILA, N.J., y GOMEZ-MEDINA, V. Variable biophysics of twelve systems agrosilvopastoriles in the plateau of Popayán-Cauca. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 2015, p. 11-21.
- [7] ACHIPIZ-FAJARDO, J., GÁLVEZ-CAMPO, G., MORALES-VELASCO, S. y VIVAS-QUILA, N.J. Guarango (*Mimosa quitensis*) an forage option for coldweather livestock systems. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 2014, p. 71-80.
- [8] RAO, I. *et al.* LivestockPlus: The sustainable intensification of forage-based agricultural systems to improve livelihoods and ecosystem services in the tropics. *Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales*, 3, 2015, p. 59-82, DOI: 10.17138/TGFT(3)59-82
- [9] VIVAS, N. Evaluación agronómica de 137 accesiones de *Desmodium velutinum* en suelos ácidos [Tesis Maestría en Ciencias Agrarias]. Palmira (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad Ciencias Agrarias, 2005.
- [10] ROJAS, L.S. y GUZMÁN, C.E.G. Segunda fase de la evaluación comparativa de los pastos maralfalfa, elefante verde y morado en el municipio de Pitalito, Huila (Colombia). *Revista de Investigaciones UNAD*, 9(2), 2015, p. 533-540.
- [11] POMA, A.F. Propuesta de mejoramiento de potreros para la alimentación del ganado bovino de leche en el sector minas, barrio Zamora Huayco, cantón Loja [Tesis Licenciatura]. Loja (Ecuador): Universidad Nacional de Loja, 2016, 93 p.
- [12] FORTES, D., HERRERA, R.S., CRUZ, A.M. and ROMERO, A. *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115 used as biomass bank. Morphophysiological indicators. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(4), 2016, p. 521-527.
- [13] TOLEDO, J. Manual para la evaluación Agronómica. Cali (Colombia): CIAT, Red Internacional de Pastos Tropicales, 1982.
- [14] DE LA CRUZ, J.M. y MUÑOZ, G.A. Análisis multitemporal de la cobertura vegetal y cambio de uso del suelo del área de influencia del programa de reforestación de la Federación Nacional de Cafeteros en el municipio de Popayán, Cauca [Tesis Especialización en Sistema de Información Geográfica]. Manizales (Colombia): Universidad de Manizales, 2016.
- [15] GÓMEZ, F.A.M. Susceptibilidad a la erosión hídrica de suelos en la zona Andina del departamento del Cauca Colombia. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 1(26), 2014, p. 43-48.
- [16] CALZADA-MARÍN, J.M., ENRÍQUEZ-QUIROZ, J.F., HERNÁNDEZ-GARAY, A., ORTEGA-JIMÉNEZ, E. y MENDOZA-PEDROZA, S.I. Análisis de crecimiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum sp.*) en clima cálido subhúmedo. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5(2), 2014, p. 247-260.
- [17] TOLEDO, J. Manual para la evaluación Agronómica. Cali (Colombia): Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Red Internacional de Pastos Tropicales, 1982.
- [18] MORALES-VELASCO, S., VIVAS-QUILA, N.J. y TERAN-GOMEZ, V.F. Livestock eco-efficient and adaptation to climate change. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 2016, p. 135-144.

-
- [19] UNIVERSIDAD DEL CAUCA. FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL. Estación meteorológica. Popayán (Colombia): 2014.
- [20] CARDONA, D. y LEÓN, O. Establecimiento de tres gramíneas forrajeras de corte en el peniplano de Popayán [Tesis Ingeniería Agropecuaria]. Popayán (Colombia): Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, 2015.
- [21] GONZÁLEZ, I. *et al.* Producción y composición química de forrajes de dos especies de pasto Elefante (*Pennisetum sp.*) en el Noroccidente de Venezuela. *Zootecnia tropical*, 29(1), 2011, p. 103-112.
- [22] CALZADA-MARÍN, J., ENRÍQUEZ-QUIROZ, J., HERNÁNDEZ-GARAY, A., ORTEGA-JIMÉNEZ, E. and MENDOZA-PEDROZA, S. Growth analysis of maralfalfa grass (*Pennisetum sp.*) in a warm humid climate. *Revista mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(2), 2014, p. 247-260.
- [23] VIVAS-QUILA, N.J. and CHARO-ELVIRA, L.E. Response of the palm grass (*Setaria poiretiana*) to the somber: a choice of production in systems silvo-pastoral. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 2014, p. 161-169.

Genotoxicity analysis by presence of arsenic in soil: test *Tradescantia* micronucleus extracts by clone 4430 (trad-mcn)

Análisis de genotoxicidad por presencia de arsénico en el suelo: prueba de micronucleos en extractos de *Tradescantia* clone 4430 (trad-mcn)

Análise de genotoxicidade por presença de arsênio em solo: teste de extractos de micronúcleos de *Tradescantia* pelo clone 4430 (trad-mcn)

MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ¹, FRANCISCO PRIETO-GARCÍA²,
ELENA MARÍA OTAZO-SÁNCHEZ², JUDITH PRIETO MÉNDEZ³,
OTILIO ARTURO ACEVEDO-SANDOVAL³

ABSTRACT

Arsenic is a toxic metalloid that is present in air, water and soil. Soil bacteria play an important role in the oxidation of this element. This article describes the use of plants

Recibido para evaluación: 5 de Mayo de 2018.

Aprobado para publicación: 2 de Octubre de 2018.

- 1 Academic Studies Center on Environmental Pollution, University of Queretaro, Ingeniero Químico Ambiental, Cerro de las Campanas s/n. Querétaro, México.
- 2 Academic Area of Chemistry, Autonomous University of Hidalgo State. Pachuca, México.
- 3 Institute of Agricultural Sciences, Autonomous University of Hidalgo State, Rancho Universitario. Tulancingo, México.

Correspondence: prietog@uaeh.edu.mx

as bioassay for the detection of genotoxicity induced leaching of soils with arsenic (As). Test micronuclei induction was used stem cells pollen *Tradescantia* clone 4430 (Trad-MCN). The results demonstrate that the micronuclei frequency was higher for soil leachate from the community of the Salitre, Hidalgo, and the community of Bella Vista del Río, Querétaro, in Mexico. Compared with the control group of leachates soil for the Municipality of Querétaro. In all cases there was a significant difference (Tukey $p > 0,05$). Also resulting in good linear correspondence $R^2 = 0,94$ and the slope of the equation that represents a velocity induced MNs 0,5/100 tetrads each $\mu\text{gAs}\cdot\text{L}^{-1}$.

RESUMEN

El arsénico es un metaloide tóxico que está presente en el aire, el agua y el suelo. Las bacterias del suelo juegan un papel importante en la oxidación de este elemento. Este artículo describe el uso de plantas como bioensayo para la detección de lixiviación inducida por genotoxicidad de suelos con arsénico (As). Se utilizó como prueba, la inducción de micronúcleos en células de polen de *Tradescantia* clon 4430 (Trad-MCN). Los resultados demuestran que la frecuencia de aparición de micronúcleos fue más alta para el lixiviado del suelo de la comunidad de Salitre, Hidalgo y para la comunidad de Bella Vista del Río, Querétaro, en México, comparados con el grupo control de lixiviados del suelo para el Municipio de Querétaro. En todos los casos hubo una diferencia significativa (Tukey $p > 0,05$). También resultó en una buena correspondencia lineal $R^2 = 0,94$ y la pendiente de la ecuación que representa una velocidad de MNs inducidos 0,05/100 tétradas cada $\mu\text{gAs}\cdot\text{L}^{-1}$.

RESUMO

O arsênico é um metalóide que está presente no ar, a água e o solo. As bactérias do solo são um importante papel na oxidação deste elemento. Este artigo descreve o uso de plantas como bioensaio para a detecção de lixiviação induzida pela genotoxicidade de suelos con arsénico (As). Use, como resultado, a indução de micronúcleos em células de pólen de *Tradescantia* clon 4430 (Trad-MCN). Resultados demuestran frecuencia de aparección de micronúcleo fue más alta para o lixiviado do suelo da comunidade de Salitre, Hidalgo y para a comunidade de Bella Vista del Río, Querétaro, en México, comparados con el grupo controle de lixiviados del suelo par Municipio de Querétaro. En todos os casos principais e uma diferença significativa (Tukey $p > 0,05$). Mais resultados em uma correspondência linear $R^2 = 0,94$ e o progresso da equação que representa uma velocidade de MNs inducidos 0,05/100 tétradas cada $\mu\text{gAs}\cdot\text{L}^{-1}$.

INTRODUCTION

Arsenic is a toxic metalloid that is present in air, water and soil. In nature, it can be found as an inorganic form when combined with oxygen, sulfur and chlorides. Soil bacteria play an important role in the oxidation of this element. It is most prevalent form found in air samples is arsenic trioxi-

KEY WORDS:

Tradescantia, Micronuclei, Zimapán, Arsenic, Genotoxicity.

PALABRAS CLAVE:

Tradescantia, Micronúcleos, Zimapán, Arsénico, Genotoxicidad.

PALAVRAS-CHAVE:

Tradescantia, micronúcleos, Zimapán, Arsênico, Genotoxicidade.

de (As_2O_3) whereas a variety of arsenates (AsO_4^{3-}) or arsenite (AsO_2^-) are found in water, soil, or food [1,2]. Arsenic can act as genotoxic agent, causing adverse effects on human health and other organisms [3]. It is through inhalation of powders, ingestion of plants that have absorbed arsenic from soil, or from drinking Arsenic dissolved in that water that this element enters the food chain causing problems such as skin cancer (keratosis) as well as lung or liver cancer [4,5]. A number of studies have been conducted to detect genotoxic activity as a result of human activity, especially when mining is involved [6]. There are arsenic compounds that are known to induce mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects resulting in a high incidence of oncological diseases [7]. Through experimental models genotoxic effects have been found in organisms exposed to these compounds. Clinical signs of these effects include gastrointestinal irritation, vomiting, diarrhea, nausea, and abdominal pain. These symptoms were observed in all cases, which were exposed to high doses of inorganic arsenic for a short-term and in low doses over a long-term [8,9]. In animal studies, lesions were found that caused gastrointestinal bleeding. For example, in monkeys that were given $6 \text{ mg As kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ diet for a month, intestinal inflammation and bleeding were found [6]. Currently, there are a large number of bioassays both *in vitro* and as well as short and long term, to determine the genotoxicity of inorganic arsenic. *Tradescantia* clone 4430 (Hybrid X T. T. *Subacaulis hirsutiflora*) is one of the bioassays that has been used to detect genotoxic effects of heavy metals [10,11]. Many studies mention that these plants are highly sensitive to toxins found in the environment such as pesticides and other inorganic compounds [11-17]. Chemicals such as lead tetra-acetate and arsenic trioxide induced micronucleus formation in *Tradescantia* clone 4430 (Trad-MCN) [13,18]. The aim of this study was to compare the effects of genotoxicity of six leachate soils from three separate sites semi-desert states located in the states of Querétaro and Hidalgo, Mexico, with known arsenic, using a bioassay (Trad-MCN).

METHOD

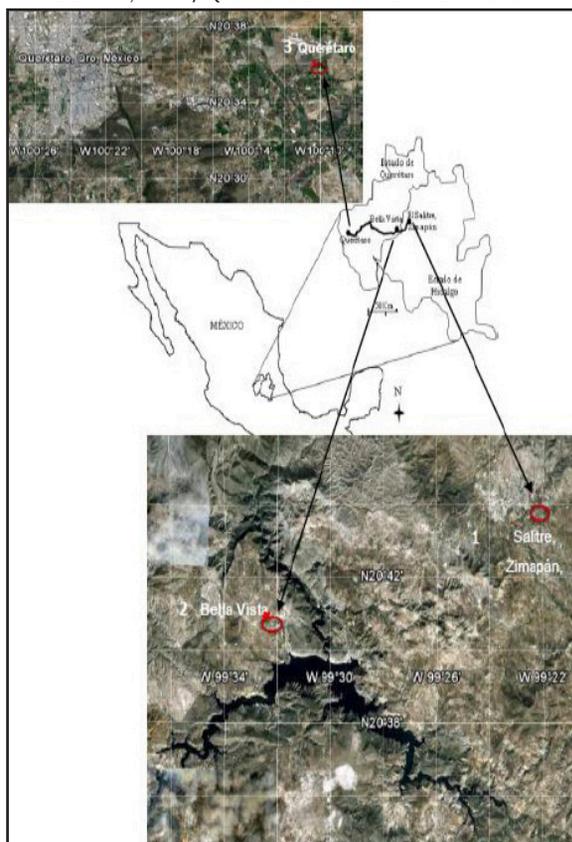
Samples

Soil and water samples from three sites located in the semi-desert area of the states of Querétaro and Hidalgo were taken. Site (1) El Salitre, is located within the

mining district of Zimapán, with an altitude of 1,780 meters above sea level and $20^\circ 44' \text{ N } 99^\circ 23' \text{ W}$; Site (2), Bella Vista del Rio which is located at $20^\circ 40' \text{ N}$ and $99^\circ 32' \text{ W}$ to 20 miles from Salitre, along the border of the states of Hidalgo and Querétaro. The third site (3), which was used as control, near the town of Querétaro $20^\circ 35' \text{ N}$ and $100^\circ 11' \text{ W}$ (Figure 1).

Pots (30 in total) were prepared with 1,5 kg of soil. The soils were washed with 500 mL of water each site; Salitre in Zimapán, Bella Vista del Rio in Querétaro, and Querétaro soils (negative control). In addition, soil from Salitre was washed with ground water from Querétaro to which a concentration of arsenic ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was added to serve as a positive control. Over a time period of approximately four months four separate samples were obtained each with an interval of 21 days between preparations. The leachates were collected in plastic bags and kept refrigerated at -4°C until used for genotoxicity tests.

Figure 1. Location of the sampling sites. 1) Salitre, Zimapán $20^\circ 44' 51'' \text{ N } 99^\circ 22' 15'' \text{ W}$; 2) Bella Vista $20^\circ 40' 35'' \text{ N } 99^\circ 32' 16'' \text{ W}$; and 3) Querétaro $20^\circ 35' 52'' \text{ N } 100^\circ 10' 33'' \text{ W}$.



Analysis of water

Water analysis was conducted in Salitre, Zimapán, Bella Vista and Querétaro. This same water was used for watering twice a month. The pH, conductivity (EC), redox potential (Eh), and the concentration of arsenic (As) were determined. These analyzes were used as a baseline for watering the pots, following the provisions of current Official Mexican Regulations [19].

Experimental conditions for obtaining leachate

In order to collect leachate from the pots previously mentioned the following experiment was performed; Experiment A: SZ-soil Zimapán (Salitre), washed with water from WZ-Zimapán. Experiment B: (SZ)-soil Zimapán (Salitre), washed with WQ-water from Querétaro. Experiment C: (SBV)- Bella Vista, Querétaro soil, washed with WBV-Agua Bella Vista, Querétaro; Experiment D: SBV- Bella Vista, Querétaro soil, washed with WQ- water from Querétaro.

Experiment F: SQ- Queretaro soil, uncontaminated, washed with WQ-Queretaro water as a negative control. A completely randomized design was carried out, taking random samples (five replications in each case).

Selecting cuts *Tradescantia*

Tradescantia clone 4430 (that is a hybrid of *T. hirsutiflora*, X *T. subacaulis*) is heterozygous was obtained from the greenhouse of the Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) of the Autonomous University of Querétaro. Cultivation was carried out in the greenhouse under controlled conditions with light (1,800 watts Fluorescent, incandescent 180 watts) photoperiod (16/8 h light/dark), temperature 21°C and 15°C and approximately 16°C at night. The relative humidity was maintained between 60 and 80% [20].

Trad-MCN

The following protocols were used [21-23], where inflorescences were selected with an approximate stem height of 10 cm, these were immersed in the aqueous extracts for each of the six experiments. Approximately 10 sections for each experiment were used and the treatments were conducted in a greenhouse under controlled conditions. The exposure time was 6

hours with 24 hours of recovery in Hoagland nutrient solution for each sample. The inflorescences were fixed in an ethanol - acetic acid (3:1) and stained with 0,5% acetocarmine. The number of cells in tetrad stage containing 1, 2, 3 or more micronuclei and 300 cells were counted for each preparation were recorded.

Statistical Analysis

All data was analyzed using (ANOVA) variance and Tukey test ($p < 0,05$) with 5.01 JMP statistical package.

RESULTS

Characterization of the three soils and the water

The pH values, redox potential (Eh), electrical conductivity (EC) of the three soils showed some differences. The pH values classified as neutral for Querétaro soils [24,25] soils of Bella Vista and El Salitre moderately alkaline, the table 1 shows these results.

The CE of the three soils demonstrated similar and redox potential (Eh), they were classified as intermediate reducers without significant differences however with the Querétaro soil. There were significant differences [24]. Compared to Zimapán, Salitre soils where the concentrations were $(726,71 \pm 42,91 \mu\text{g As.kg}^{-1})$. These concentrations were the highest found. This is due to geomorphological origin. Next, in order of decreasing natural contamination, Bella Vista soil, with $73,25 \pm 1,35 \mu\text{g As.kg}^{-1}$, which is ten times less than the soil of Salitre. In these two cases, the concentrations indicate the geographical proximity and identify them as soils with low As concentrations ($< 40 \mu\text{g As.kg}^{-1}$). The Querétaro soil which was taken only as reference contained concentrations of $12,67 \pm 1,15 \mu\text{g As.kg}^{-1}$.

Table 1. Results of the averages of analysis of the soils of the three regions studied. In parenthesis is the standard deviation.

	Site		
	Salitre, Zimapán Hidalgo	Bella Vista, Querétaro	Querétaro, Querétaro
pH	8,11 (0,06) ^a	8,18 (0,01) ^a	7,10 (0,05) ^b
[As] ($\mu\text{gAs.kg}^{-1}$)	726,71 (42,91) ^a	73,25 (1,35) ^b	12,67 (1,15) ^c
Different letters in rows indicate significant Differences ($p < 0,05$)			

The results of the characterization of the water used for irrigation are shown in cuadro 2.

A significant difference was determined in concentrations of As (in all cases HAsO_4^{-2} shaped, according to Pourbaix diagram Eh vs pH). It is observed that the initial concentration of As the water used to irrigate Zimapán exceeds 9,5 times the NOM-127-SSA1, so it is also valid for positive control; Water Bella Vista exceeds 2,5 times the standard and meets Querétaro water content $<10 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Genotoxic activity of leachate (Tradescantia clone 4430)

There are precedents that mention that soils may contain genotoxic compounds such as the study by [17] found an increase in the frequency of micronuclei in Tradescantia clone 4430 to expose this plant outage leached from soils contaminated with heavy metals. The results for genotoxicity of leachate from soils under study, can be seen in cuadro 3. The leachate SQ/WQ was taken as negative control, because in the water of this site concentration (As) is below the allowable limit set by the NOM-127-SSA1-1994 and presented a value of $1,6 \pm 0,34$ micronuclei. The leaching of SQ/WQC with $8,5 \pm 0,37$ micronuclei taken as a positive control, showed a significant difference from the control. This difference shown in the frequency of micronuclei is attributed to the concentration of arsenate added intentionally, but unlike the results found in leachate SZ/WZ and SZ/WQ which were $7,1 \pm 0,21$ and $4,8 \pm 0,33$ micronuclei micronuclei, respectively and also showed significant difference ($p < 0,01$), the first very similar to SQ/WQC, but for this experiment also provided

soil arsenic concentration in this case in previous studies was the soil with the highest concentration ($726,71 \text{ g. kg}^{-1} \text{ As}$) and because of this it can be said that the leachate more damage caused was to SZ/WZ, corresponding with the analysis in a study by the Institute of Geophysics of the National Autonomous University of Mexico (IGEF), arsenic found in water, soil and mineral sediments, in the Zimapán population of Hidalgo.

Likewise Prieto *et al.* [26] found that the frequency of MNs in experimental Zimapán water samples showed significant differences from control in apical meristem cells of *Vicia faba*. Finally, in leachates from soils of Bella Vista SBV/WBV, it was found that this presented genotoxic damage with a frequency of $5,9 \pm 0,80$ micronuclei and SBV/WQ with a value of $5,2 \pm 0,57$ micronuclei between these two leachate no significant difference $P > 0,05$ was presented, but if compared to the control group SQ/WQ, $P < 0,01$. The values of arsenic ($73,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$) for this site were ten times lower compared

Table 2. Average results of characterization of the water used for irrigation.

Water	pH	CE (dS/cm)	As ($\mu\text{g.L}^{-1}$) initial	As ($\mu\text{g.L}^{-1}$) Leachate
Salitre, Zimapán, Hidalgo	7,86 (0,03) ^a	0,21 (0,06) ^c	94,6 (0,18) ^d	107,32 (0,38) ^e
Bella Vista, Querétaro	7,75 (0,04) ^a	0,18 (0,04) ^c	24,6 (0,11) ^e	31,52 (0,27) ^h
Querétaro, Querétaro	8,01 (0,04) ^a	0,23 (0,06) ^c	7,2 (0,06) ^f	7,34 (0,07) ⁱ

Different letters in the columns indicate significant differences ($p < 0,05$)

Table 3. Results of the frequency of micronucle/100 tetrads, exposed soil leachate Querétaro, Queretaro, Salitre Hidalgo and Bella Vista Qro.

Leachate	Stage I		Stage II		Stage III		Stage IV		Average	
	As	MCNs	As	MCNs	As	MCNs	As	MCNs	As	MCNs
SZ/WZ	128,96	7,1	141,41	10,70	124,04	9,20	116,93	7,2	127,84±5,34	8,55±2,93
SZ/WQ	90,24	4,8	128,62	7,00	93,69	7,50	96,33	6,4	102,22±4,98	6,43±0,37
SBV/WBV	48,75	5,9	94,33	7,00	95,39	6,70	87,72	6,6	81,55±4,71	6,55±0,76
SBV/WQ	33,08	5,2	88,77	5,20	90,09	5,40	61,74	6,0	68,42±5,27	5,45±0,44
SQ/WQC(+)	89,25	4,5	150,19	9,50	151,59	8,90	156,63	8,0	136,92±5,23	7,73±0,59
SQ/WQ(-)	5,72	1,6	4,5	1,20	3,39	1,30	4,29	1,5	4,48±0,80	1,4±0,18

(+) negative control; (-) Positive Control; As in $\mu\text{g.As.kg}^{-1}$; MCNs / 100 tetrads

to that found in soil Salitre, Zimapán in Hidalgo. With the average values of the four stages the correlation between the concentration of [As] and induction of micronuclei (MNs/100 tetrads) was established. In Figure 2 the linear correspondence with an $R^2 = 0,94$ is shown, the slope of the equation (0,05) represents the speed of MCNs induced/100 tetrads per $\mu\text{gAs.L}^{-1}$. The value of the intercept represents the number of MCNs induced/100 tetrads spontaneously (see figure 3).

There are a number of studies focused on the genotoxic evaluation of soil samples, obtaining good results, focusing on the preparation of leachate and make presentations with different bioassays [27-29]. Therefore it is said that mutagenicity bioassay Proven measures to assess the genotoxicity of complex mixtures without the need to specify the chemical characterization of the sample, determining the genetic damage in living organisms [27-31].

Figure 2. Linear correlation between MNs / 100 tetrads vs [As] in $\mu\text{gAs.kg}^{-1}$.

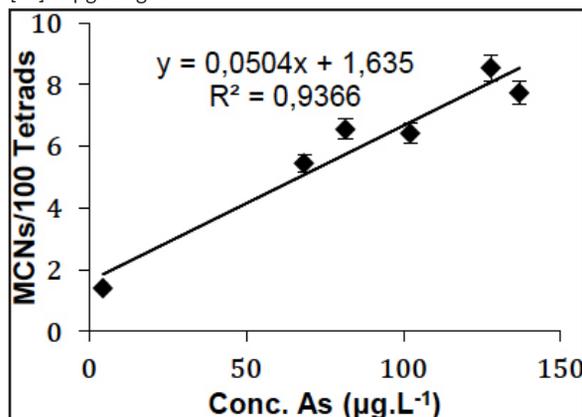
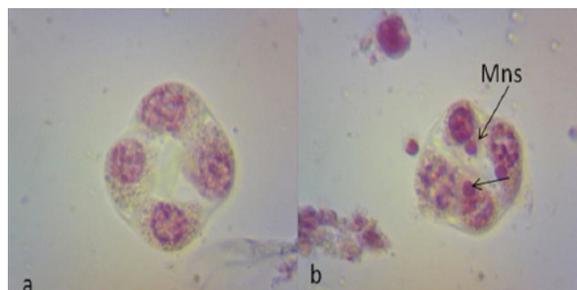


Figure 3. a) Shows a photograph of normal tetrad b) MCN in tetrads.



CONCLUSIONS

The results demonstrate that the micronuclei frequency was higher for soil leachate from the community of the Salitre, Hidalgo, and the community of Bella Vista del Río, Queretaro. Compared with the control group of leachates soil for the Municipality of Querétaro. In all cases there was a significant difference (Tukey $p > 0,05$). Also resulting in good linear correspondence $R^2 = 0,94$ and the slope of the equation that represents a velocity induced MNs 100/0.05 tetrads each $\mu\text{gAs.L}^{-1}$.

REFERENCES

- [1] GHULAM-ABBAS, B.M., IRSHAD-BIBI, M.S., NABEL-KHAN-NIAZI-ID, M.I.K., MUHAMMAD-AMJAD, M.H. and NATASHA-MAGALHAES, M.C.F. Arsenic Uptake, Toxicity, Detoxification, and Speciation in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Aspects. *International Journal of Environmental Research. Public Health*, 15(59), 2018, p. 1-45, DOI:10.3390/ijerph15010059.
- [2] PARAMITA, M. An insight of environmental contamination of arsenic on animal health. *Emerging Contaminants*, 3, 2017, p. 17-22, DOI:10.1016/j.emcon.2017.01.0042405-650/.
- [3] SEO, M.N., LEE, S.G. and EOM, S.Y. Estimation of total and inorganic arsenic intake from the diet in Korean adults. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 2016, p. 647-656.
- [4] XUESONG, X.I., LU, L., CHARALAMBOS, P. and PEI, X. Sorption of Arsenic from Desalination Concentrate onto Drinking Water Treatment Solids: Operating Conditions and Kinetics. *Water*, 10(96), 2018, p. 1-15, DOI:10.3390/w10020096.
- [5] BAE, H.S., KANG, I.G., LEE, S.G., EOM, S.Y., KIM, Y.D., OH, S.Y., KWON, H.J., PARK, K.S., KIM, H., CHOI, B.S., YU, I.J. and PARK, J.D. Arsenic exposure and seafood intake in Korean adults. *Human and Experimental Toxicology*, 36(5), 2017, p. 451-460.
- [6] BAIG, S.A., SHENG, T., HU, Y., XU, J. and XU, X. Arsenic removal from natural water using low cost granulated adsorbents: A review. *CLEAN Soil Air Water*, 43, 2015, p. 13-26.
- [7] GORBOV, S.N., BEZUGLOVA, O.S., VARDUNI, T.V., GOROVTSOV, A.V., TAGIVERDIEV, S.S. and HILDEBRANT, Y.A. Genotoxicity and Contamination of Natural and Anthropogenically Transformed Soils of the City of RostovonDon with Heavy Metals. *Eurasian Soil Science*, 48(12), 2015, p. 1383-1392.

- [8] HABUDA-STANI, M., NUJIC, M., ROMIC, Ž., LONCARIC, A., RAVANCIC, M.E. and KRALJ, E. Arsenic preoxidation and its removal from groundwater using iron coagulants. *Desalination Water Treatment*, 56, 2015, p. 2105–2113.
- [9] ABEJÓN, A., GAREA, A. and IRABIEN, A. Arsenic removal from drinking water by reverse osmosis: Minimization of costs and energy consumption. *Separation and Purification Technology*, 144, 2015, p. 46–53.
- [10] TE-HSIU, M.A., XU, Z., XU, C., MCCONNELL, H., RABAGO, E.V., ARREOLA, G.A. and ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation research*, 334(2), 1995, p. 185–95.
- [11] MELO-DE-CARVALHO, R., LAÍS -COUTO-MACHADO, J., SOUSA DE AGUIAR, R.P., OLIVEIRA-FERREIRA DA-MATA, A.M., RODRIGUES-SILVA, R., SILVA-TEIXEIRA, J., OLIVEIRA-BARROS-DE-ALENCAR, M.V., TOREQUL-ISLAM, M. and DE CARVALHO-MELO-CAVALCANTE, A.A. *Tradescantia pallida* as a biomonitoring tool to assess the influence of vehicle exhaust and benzene derivatives. *African Journal of Biotechnology*, 16(6), 2017, p. 280–287, DOI: 10.5897/AJB2017.15897.
- [12] SANTOS, A.P.M., SEGURA-MUÑOZ, S.I., NADAL, M., SCHUHMACHER, M. and DOMINGO J.L. Traffic-related air pollution biomonitoring with *Tradescantia pallida* (rose) Hunt. cv. purpurea Boom in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(2), 39, 2015, p. 1–10.
- [13] LIMA, A.V.A., BARBOSA, M.A.S., CUNHA, L.C.S., DE MORAIS, S.A.L., DE AQUINO, F.J.T., CHANG, R. and DO NASCIMENTO, E.A. Volatile Compounds Obtained by the Hydrodistillation of Sugarcane Vinasse, a Residue from Ethanol Production. *Revista Virtual de Química*, 2017, 9(2), p. 764–773, DOI: 10.21577/1984-6835.20170047.
- [14] SANTOS, A.P., SEGURA-MUÑOZ, S.I., NADAL, M., SCHUHMACHER, M., DOMINGO, J.L., MARTINEZ, C.A. and MAGOSSO-TAKAYANAGUI, A.M. Traffic-related air pollution biomonitoring with *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 2015, p. 1–10.
- [15] BETÂNIA-BRIZOLA-CASSANEGO, M., MARQUES-DA-COSTA, G., HISAYUKI-SASAMORI, M., ENDRES-JÚNIOR, D., TAMARES-PETRY, C. and DROSTE, A. The *Tradescantia pallida* var. purpurea active bioassay for water monitoring: evaluating and comparing methodological conditions. *Revista Ambiente y Agua*, 9(3), 2014, p. 424–433, DOI: 10.4136/ambi-agua.1411.
- [16] OLLER-CRUZ, O.J. Empleo de bioindicadores para determinar la calidad del aire en la ciudad de Tarija en puntos de muestreo de red Moni-CA. *Acta Nova*, 8(3), 2018, p. 307–321.
- [17] PO-WEN, C., ZHEN-SHU, L., MIN-JIE, W. and TAI-CHEN, K. Cellular Mutagenicity and Heavy Metal Concentrations of Leachates Extracted from the Fly and Bottom Ash Derived from Municipal Solid Waste Incineration. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(11), 2016, p. 1078, <https://doi.org/10.3390/ijerph13111078>.
- [18] MISIK, M., MA, T.H., NERSESYAN, A., MONARCA, S., KIM, J.K. and KNASMUELLER, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. *Mutagenesis*, 26(1), 2011, p. 215–221.
- [19] MÉXICO. NOM-127-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse para su potabilización. México D.F. (México): Diario Oficial de la Federación, 1996.
- [20] BAKARE, A.A., ALIMBA, C.G. and ALABI, O.A. Genotoxicity and mutagenicity of solid waste leachates: A review. *African Journal of Biotechnology*, 12(27), 2013, p. 4206–4220.
- [21] CURADO, A.L., CUNHA DE OLIVEIRA, C., COSTA, W.R., BORELLA-MARFIL-ANHÊ, A.C. and MILLA- DOS SANTOS-SENHUK, A.P. Urban influence on the water quality of the Uberaba River basin: an ecotoxicological assessment. *Revista Ambiente y Agua*, 13(1), 2018, p. 1–10.
- [22] CARTER, L.J., HARRIS, E., WILLIAMS, M., RYAN, J.J., KOOKANA, R.S. and BOXALL, A.L. Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Plant Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 2014, p. 816–825, DOI: 10.1021/jf404282y.
- [23] DHYEVRE, A., FOLT ETE, A.S., ARAN, D., MULLER, S. and COTELLE, S. Effects of soil pH on the Vicia-micronucleus genotoxicity assay. *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 774, 2014, p. 17–21.
- [24] BOULDING, J.R. Description and sampling of contaminated soils. A field guide. 2 ed. eBook ISBN 9781351456142. Boca Raton (USA): FL7 Lewis Publishers, 2017, p. 12–16. file:///C:/Users/Administrador/Documents/Downloads/9781351456142_preview.pdf

- [25] MEDINA-GUERRERO, M.L. y ZANOR, G.A. Evaluación de la contaminación por elementos traza en suelos agrícolas de municipio de Ira-puato (Guanajuato). Jóvenes en la Ciencia, 3(1), 2017, p. 295-299.
- [26] PRIETO, G.F., LECHUGA, V.M.A., MÉNDEZ, M.M.A., BARRADO, E.E.Y. y OYARZÚN, G.J. Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapan, Hidalgo México. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26(1), 2006, p. 94-97
- [27] CHAHAL, V., NAGPAL, A., PAKADE, Y.B. and KATNORIA, J.K. Ecotoxicological Studies of Soil Using Analytical and Biological Methods: A Review. International Journal of Biotechnology and Bioengineering, 8(3), 2014, p. 302-318.
- [28] MUNAWAR, I. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. Chemosphere, 144, 2016, p. 785-802.
- [29] MENESTRINO-GARCIA, E., RODRIGUES-DA SILVA-JUNIOR, F.M. and MUCCILLO-BAISCH, A.L. Mutagenic effect of contaminated soil on the offspring of exposed rats. Acta Scientiarum, Health Sciences Maringá, 38(1), 2016, p. 19-22.
- [30] SABZAR, A.D., ABDUL-REHMAN, Y. and MASOOD-UL-HASSAN, B. An Introduction about Genotoxicology Methods as Tools for Monitoring Aquatic Ecosystem: Present Status and Future Perspectives. Fisheries and Aquaculture Journal, 7, 158, 2016, p. 1-11, DOI:10.4172/2150-3508.1000158.
- [31] RASHMI, K., SHELJA, S. and AVINASH, K.N. Comparative antigenotoxic effects of aqueous leaf extracts of different cultivars of *Chrysanthemum morifolium* R. against genotoxicity induced by mercuric chloride using *Allium cepa* L. root chromosomal aberration assay. Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences, 5(2), 2018, p. 87-92.

Hidrólisis enzimática en harina de quinua y tarwi por efecto de α -amilasa

Enzymatic hydrolysis in quinoa y tarwi flour by α -amylase effect

Hidrólise enzimática em farinha de quinua e tarwi por efeito do α -amilasa

NANCY ALEJANDRA NAVIA-COARITE¹, GASTON LUIS NINA-MOLLISACA²,
EVELIN PATY MENA-GALLARDO³ & LILY SALCEDO-ORTIZ^{4*}

RESUMEN

*La quinua y el tarwi se caracterizan por ser altamente nutritivos, con el fin de aumentar su consumo se buscan nuevas alternativas de procesos alimentarios, artesanales y biotecnológicos. En este estudio se evaluó la digestibilidad de polisacáridos contenidos en harina de quinua real (*Chenopodium quinoa Willd*), variedad blanca (QB), negra (QN) y en oligosacáridos contenidos en harina de tarwi (*Lupinus mutabilis*)*

Recibido para evaluación: 2 de Mayo de 2018.

Aprobado para publicación: 2 de Noviembre de 2018.

- 1 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. Lic. en Ciencias Químicas. La Paz, Bolivia.
- 2 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. Lic. en Ciencias Químicas. La Paz, Bolivia.
- 3 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. Est. de Ciencias Químicas. La Paz, Bolivia.
- 4 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. MSc. en Productos Naturales. La Paz, Bolivia.

*Correspondencia: e-mail: priebiet2004@gmail.com; lsalcedo@fcfn.edu.bo

(T) por aplicación enzimática de *a*-amilasa in vitro. El análisis proximal de los granos (métodos AOAC), mostró valores similares a los de referencia. Se cuantificó el contenido de azúcares libres en harina de los granos, encontrándose en %, 10,05 ± 0,3 para QB, 8,25 ± 0,3 para QN y 0,19 ± 0,01 para T. Se determinó el contenido de almidones, 51,08 ± 0,3% en QB y 49,04 ± 0,4% en QN. Los azúcares reductores por efecto de Termamyl Sc en % de sustrato fue de 25 ± 1,9 (QB), 27,5 ± 1,5 (QN) y 2,01 ± 0,3 (T). Los parámetros cinéticos encontrados: Km: 80,4 mg/mL, Vmax 0,36 mg/mL min⁻¹ (QB); Km: 98,8 mg/mL, Vmax 1,72 mg/mL min⁻¹ (QN); T: Km: 3,14 mg/L y Vmax 4,81 mg/mL/min⁻¹, se derivaron del gráfico de Lineweaver Burk.

ABSTRACT

Quinoa and tarwi are characterized by their high nutritional value so their crops have spread to various countries. In recent years to increase consumption new food processing alternatives are sought, artisanal and biotechnological. In this study the digestibility of polysaccharides contained in quinoa flour (*Chenopodium quinoa* Willd), white variety (QB), black variety (QN) and oligosaccharides of tarwi flour (*Lupinus mutabilis*) (T) by enzymatic application of *a*-amylase was evaluated in vitro. The proximal analysis of the grains was performed, finding values similar to those of reference (AOAC methods). The content of free sugars in flour of the grains was 10,05 ± 0,3 for QB, 8,25 ± 0,3 for QN and 0,19 ± 0,01 for T. The starch content was determined, 51,08 ± 0,3% in white quinoa (QB) and 49,04 ± 0,4% in black quinoa (QN). The reducing sugars by the effect of Termamyl Sc in % of substrate was 25 ± 1,9 (QB), 27,5 ± 1,5 (QN) and 2,01 ± 0,3 (T). The kinetic parameters found: Km: 80,4 mg/mL, Vmax: 0,36 mg/mL min⁻¹ (QB); Km: 98,8 mg/mL, Vmax: 1,72 mg/mL min⁻¹ (QN); Km: 3,14 mg/L and Vmax 4,81 mg/L min⁻¹ (T), were derived from the Lineweaver Burk plot.

RESUMO

Quinoa e tarwi são caracterizados por serem altamente nutritivos, de modo que suas culturas se espalharam para vários países. Para aumentar o consumo, novas alternativas de alimentos, processos artesanais e biotecnológicos são buscadas. Neste estudo, a digestibilidade de polissacáridos contido na farinha quinoa real (*Chenopodium quinoa* Willd), variedade branca (QB), a variedade preta (QN) e oligossacáridos contidos na farinha de Tarwi (*Lupinus mutabilis*) (T), por aplicação enzimática foi avaliada de *a*-amilase in vitro. A análise proximal dos grãos (métodos AOAC) apresentou valores semelhantes aos de referência. o teor de açúcares livres na reunião grãos de farinha de 10,05 ± 0,3 para QB, determinou-se 8,25 ± 0,3 e 0,19 ± 0,01 QN conteúdo T. amido, 51,08 ± 0,3% 49,04 ± 0,4% QB e foi quantificada em QN Os açúcares reductores de Termamyl Sc em % de sustrato foram de 25 ± 1,9 (QB), 27,5 ± 1,5 (QN) e 2,01 ± 0,3 (T). Os parâmetros cinéticos encontrados: Km: 80,4 mg/mL, Vmax 0,36 mg/mL min⁻¹ (QB); Km: 98,8 mg/mL Vmax 1,72 mg/mL min⁻¹ (QN); T: Km: 3,14 mg/L e Vmax 4,81 mg/L min⁻¹, foram derivados do gráfico de Lineweaver Burk.

PALABRAS CLAVE:

Chenopodium quinoa, *Lupinus mutabilis*, Carbohidratos, Parámetros cinéticos

KEYWORDS:

Chenopodium quinoa, *Lupinus mutabilis*, Carbohydrates, Kinetic parameters.

PALAVRAS CHAVE:

Chenopodium quinoa, *Lupinus mutabilis*, Carboidratos, Parâmetros cinéticos

INTRODUCCIÓN

Los granos andinos, como quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y Tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) son alimentos originarios de la zona andina de Sud América [1, 2], la quinua, es el grano, cuyo alto valor nutritivo ha generado un alto nivel de exportación del grano beneficiado, particularmente de Bolivia y Perú, actualmente toda la región andina, desde Colombia hasta el norte de Chile y Argentina, han incentivado su producción [3], ingresando a una competencia inusual. La demanda de mercado internacional ha favorecido la producción de 4 variedades de quinua real en Bolivia: Real Blanca, Toledo, Phisanqalla (grano rojo o café), y C´hiara (grano negro) [4]. Por otro lado, el Tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) que presenta alto valor nutritivo, tiene menor grado de estudio, lo que ha limitado su comercialización. Se debe destacar que el proceso de des-amargado de Tarwi y el proceso de beneficiado de la quinua son factores que elevan los costos de su comercialización.

Se han realizado muchos estudios sobre el efecto de consumo de quinua en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, entre las más reportadas están sus propiedades anti-oxidantes [5-7], anti-inflamatoria [8, 9], inmunomodulador [10], anticancerígenas [11], hipo-colesterolemia y antihipertensivo [12, 13]. En base a estos estudios científicos se prevén perspectivas nutraceuticas de la quinua y aplicaciones funcionales beneficiosas para la salud humana [14]. Por lo que actualmente está siendo cultivada en América del Norte, Europa, regiones subtropicales de África y Asia, más de 50 países han iniciado su cultivo [3,15].

La quinua y el Tarwi presentan alta concentración de lisina, que repercute en el contenido de proteínas de alta calidad [14, 16], característica poco frecuente en alimentos vegetales. Otra característica común es su Índice Glucémico Bajo [14], que hace que estos granos sean propicios para desarrollar alimentos modificados con alta propiedad nutricional que puedan ser administrados como aditivos nutricionales específicos.

Muchas de las enfermedades crónicas que afligen a la sociedad de un modo particular (cáncer, obesidad, hipertensión, trastornos cardiovasculares) se relacionan de un modo muy estrecho con la dieta alimenticia [17], por lo que, el buscar nuevas formas de consumo de alimentos altamente nutritivos como

los granos andinos son necesarios, para incrementar su consumo en diversas formas.

En el presente estudio se identificó el porcentaje de hidrólisis biológica por aplicación de α -amilasa Termamyl Sc en harinas desengrasadas de granos andinos: quinua real blanca, quinua real negra (C´hiara) y Tarwi, con todos los componentes que forman parte natural de los granos, sin introducir compuestos que alteren el pH natural, para establecer las bases de obtención de aditivos nutricionales de mejor digestión.

MÉTODO

Materia prima

Los granos orgánicos certificados de Quinoa Real Blanca, Quinoa Real Negra y Tarwi fueron entregados por la empresa de alimentos Irupana Organic Andean Food S.A.

Obtención de harina de quinua blanca (QB), quinua negra (QN) y Tarwi (T)

Los granos fueron molidos en una moladora de granos BOSCH por 10 minutos, para luego ser tamizado en tamices de acero norma ASTM 11 [18], obteniéndose la harina compuesta.

Análisis proximal

El análisis proximal se determinó de acuerdo a métodos AOAC establecidas en la Norma Boliviana. Humedad, ceniza, fibra, lípidos, proteínas (N x 6,25) [19], los carbohidratos por determinación indirecta.

Harina desengrasada

Se procedió por el método soxhlet [18].

Cuantificación de azúcares libres y totales

La cuantificación de azúcares libres en harina de granos completa y desengrasada, se realizó por el método Dubois (Método fenol sulfúrico) por triplicado [19, 20]. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Génesis 10S UV-VIS a 490 nm. Para azúcares libres (QB y QN) se pesaron 100 mg llevando a 100 mL con agua destilada (100 mg.dL⁻¹) se mezcló por 5 minutos, se centrifugó por 5 min a 3500 rpm, se tomó la muestra del sobrenadante.

Para el Tarwi, se procedió por el método DNS después de una hidrólisis ácida en base a una curva patrón [21].

Almidones

La determinación de almidones se realizó por el método AOAC 996.11 [22], utilizando curva patrón de glucosa.

Enzima

Termamyl Sc, una α -amilasa termo estabilizable de *Bacillus licheniformis*, se utilizó para la licuefacción de almidones contenido en harina desengrasada de granos andinos. La actividad enzimática de la enzima de 120 KNU g^{-1} , donde cada unidad de kilo novo α -amilasa (KNU) descompone 5,26 g de almidón por hora en condiciones normales, pH recomendado 5,4 - 5,8, dosaje recomendado de 0,15 - 0,45 Kg/ton de almidón [23], equivalente a una relación enzima/sustrato (E/S) 0,015 - 0,045.

Hidrólisis enzimática

Sobre la base de pruebas preliminares, tomando en cuenta la dificultad en la agitación por la consistencia provocada por la gelatinización de las diferentes muestras de quinua real blanca (QB), quinua real negra (QN) y Tarwi (T), se establecieron diferentes concentraciones de sustrato (almidón), en las quinuas y oligosacáridos en el tarwi (Cuadro 1), se realizó la hidrólisis de almidones en harina de los granos desengrasados por aplicación de la enzima Termamyl Sc, en reactores preparados con balones de 3 bocas de 500 mL conectado a refrigerante, en baño maría sobre platos térmicos con agitación y temperatura regulables, considerando que los granos contienen componentes propios que forman una matriz adecuada para la hidrólisis, no se utilizaron soluciones tampón ni adición de calcio. Se homogenizó a agita-

ción constante, dejando ebullición por 5 min para la gelatinización, se trabajó a 85°C. Con base en datos de la ficha técnica de Termamyl Sc, con 20 uL (0,0252 g) de enzima por triplicado. Previa cuantificación de azúcares reductores se inactivo con HCl 0,5 N para el seguimiento del proceso enzimático se utilizó el método de Fehling [24], realizando una dilución 1:6 para la QB, 1:2,5 para QN, para el Tarwi se utilizó el método Dubois con dilución 1:10.

Los parámetros cinéticos de Km y Vmax para Termamyl Sc en una matriz de harina de granos (QB, QN y T) sin grasas fueron estimados, en condiciones de pH propios de cada grano: QB, pH 5,6; QN, pH 5,5; T pH 5,0. Se utilizó la doble recíproca de Lineweaver Burk en base a la cinética de Michaelis - Menten, con la siguiente ecuación.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (DS). Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa SPSS Statistics. Se utilizó la prueba de Duncan para el análisis proximal y Tukey para las demás evaluaciones.

RESULTADOS

Análisis proximal de Quinua Real Blanca, Quinua Negra y Tarwi

Los valores obtenidos del análisis proximal (Cuadro 2), se encuentran dentro rangos encontrados en

Cuadro 1. Relación E/S para la aplicación de termamyl® en harina desengrasada de quinua real blanca(QB), quinua real negra (QN) y Tarwi (T).

QB	QB	QN	QN	T	T
Almidón (%)	Rel. E/S	Almidón (%)	Rel. E/S	Oligosacáridos (%)	Rel. E/S
5	0,5	1,5	1,7	0,85	3,0
7,5	0,34	3,0	0,84	1,28	2,0
10	0,25	4,0	0,63	1,70	1,5
12,5	0,20	5,0	0,5	2,13	1,2
15	0,17	6,0	0,42	2,55	1,0

otros estudios, particularmente de los carbohidratos totales en la quinua que varía desde 54,5 hasta 66,8 [25 - 27], está determinación de carbohidratos por diferencia incluye la fibra total dietética [28], factor que debe considerarse cuando se quiere valorar almidones u otro tipo específico de carbohidratos.

Como se puede observar, los carbohidratos en *lupinus mutabilis* representan 16,41 %, similar a otros reportes [29, 30], la composición de carbohidratos según Gross R. et al (1988), corresponde a 15% de oligosacáridos consta de estaquiosa 70%, rafinosa 17%, sacarosa 10%, verbascosa 6% en 2 variedades de *lupinus mutabilis*, carbohidratos no digeribles a excepción de la sacarosa [30], la determinación de carbohidratos por diferencia en *lupinus mutabilis* llega hasta un 28,2% [31]. En relación a las proteínas los valores encontrados se encuentran dentro de los de referencia [25, 30]. La alta concentración de proteínas da lugar a diferentes propuestas de consumo, el contenido de lisina (aminoácido esencial) de *lupinus mutabilis* se encuentra en nivel superior al recomendado FAO [32], con bajo contenido de aminoácidos azufrados por lo que se recomienda hacer combinaciones con cereales u otros [33], por las características cuantitativas y cualitativas es importante desarrollar diversos productos, artesanales y biotecnológicos para mejorar el consumo de los granos andinos estudiados.

Con respecto al valor de significancia ($p=0,000$), se concluye que la variables que influye en el análisis estadístico, son los componentes de los tres granos. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos variedades de quinua real negra y quinua real blanca en, grasa, fibra cruda y proteína, en relación a los componentes del tarwi las diferencias son significativas en todos los componentes.

Almidones

El contenido de almidones en quinua real blanca y negra (C´hiara) (Cuadro 3) son similares a los reportados por USDA (2013) de 52,2%. Los almidones de quinua han sido valorados por sus características particulares, entre las cuales resalta la alta estabilidad al congelamiento resistente a la retrogradación y deshidratación [34, 37], su consumo es recomendado para un buen rendimiento y recuperación en el deporte [2]. El almidón de quinua es altamente ramificado y consiste en pequeños gránulos (partículas tamaño menor que 2 μm de diámetro), más pequeños que las partículas de cereales comunes [35], los

almidones de la quinua han sido estudiados para su extracción por su alta estabilidad [36].

Es posible afirmar que hay diferencias significativas en el contenido de almidón total con respecto a ambas variedades de quinua ($p=0,001$).

Azúcares libres y totales

Como se puede observar en el Cuadro 4, nuestros resultados revelan alto contenido de azúcares libres en la quinua real blanca y en la quinua real negra, coincidiendo con los reportados anteriormente [36]. En otro estudio, se reportó 2,9% de sacarosa, 1,4% de maltosa, 1,7% de glucosa y 0,2% de fructuosa, como parte de azúcares libres, en materia seca [37], un reporte anterior muestra el contenido de azúcares libres hasta un 15% en la variedad Sajama con un contenido de glucosa 4,55%, fructuosa 2,41% y sacarosa 2,39% [38]. Se debe considerar que el método Dubois es sensible a todo tipo de carbohidratos, en este sentido la cuantificación de azúcares libres incluye a compuestos fenólicos glucosilados, saponinas y otros compuestos unidos a carbohidratos [38]. La presencia de azúcares libres probablemente sea variable, en relación a la época de cosecha, almacenamiento y condiciones ambientales en que se encuentren los granos. Los azúcares totales encontrados fueron de

Cuadro 2. Análisis proximal de QB, QN y T (g/100).

Componente	QB*	QN**	T***
Humedad	10,67±0,8	10,17±0,5	6,48±0,21
Cenizas	2,37±0,01	3,26±0,34	3,61±0,01
Grasa cruda	5,7±0,4	7,7±0,36	19,5±0,6
Proteínas	15,02±0,24	14,4±0,28	48,0±0,58
Fibra	3,1±0,11	6,5±0,3	6,0±0,21
Carbohidratos totales	63,06	57,97	16,41

*QB: Quinua Real Blanca
**QN: Quinua Real Negra
***T: Tarwi

Datos expresados con la media \pm SD de tres repeticiones

Cuadro 3. Almidones totales (%) de QB & QN.

Muestra	Almidones totales (%)
Quinua real blanca (QB)	51,08 \pm 0,30
Quinua real negra (QN)	49,04 \pm 0,40

Todos los datos son la media \pm SD de tres repeticiones

Cuadro 4. Azúcares libres (AL) y azúcares totales (AT), equivalentes a dextrosa (ED) en% de QB, QN y T.

Muestra	AL (%) en Harina	AL (%) Harina Desengrasada	AT (%) en Harina	AT (%) en Harina Desengrasada
Quinua Real Blanca (QB)	10,05 ± 0,30	10,80 ± 0,35	61,82 ± 1,25	66,80 ± 0,90
Quinua Real Negra (QN)	8,25 ± 0,30	8,60 ± 0,40	59,65 ± 1,10	63,90 ± 1,05
Tarwi (T)	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,01	17,20 ± 0,60	20,40 ± 0,80

Todos los datos son la media ± SD de tres repeticiones

61,82% para QB, 59,65 para QN y 17,2 para T, valores cercanos a los obtenidos por diferencia en el análisis proximal. Los azúcares libres en el Tarwi se encuentran en cantidades insignificantes, sin duda debido al proceso de des-amargado exhaustivo.

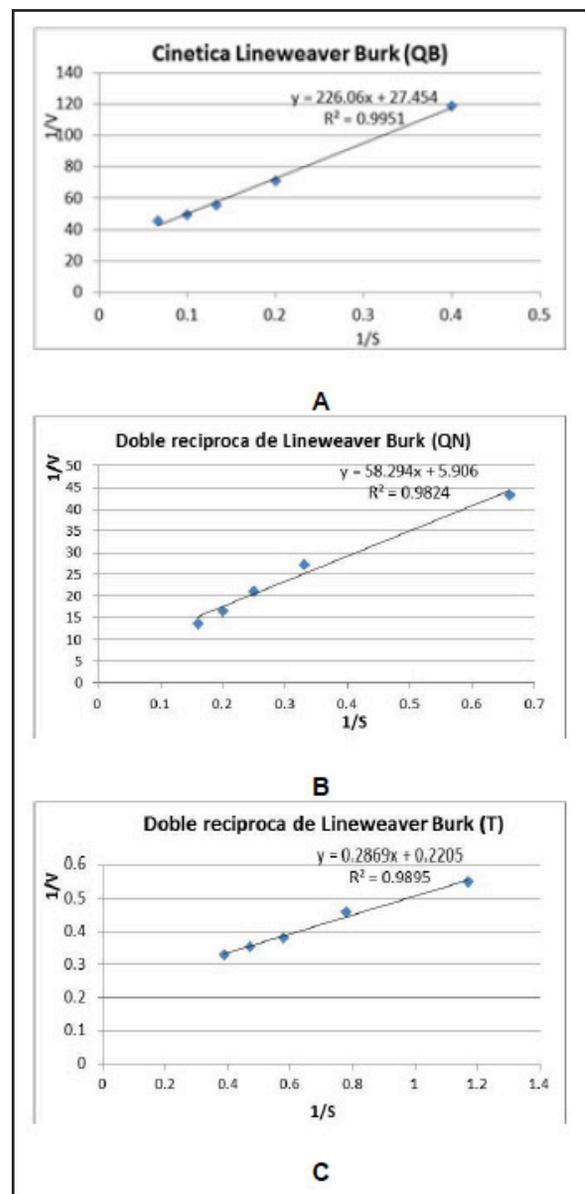
Puesto que el valor-p es menor que 0,05, existe una relación significativa de todos los factores con un nivel de confianza del 95%. Se observa diferencia significativa (p=0,999) entre los subconjuntos 1, 2 y 3, azúcares libres y azúcares totales en harina compuesta y desengrasada de QB, QN y T

El valor de significancia por Tukey (p=0,999) muestra claramente que hay diferencias significativas entre los tres granos con respecto a los azúcares libres y totales en harina compuesta y desengrasada.

Hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis de almidones por efecto de Termamyl Sc concluye aproximadamente a los 40 minutos para la quinua real blanca (QB) y a los 30 min para la quinua real negra (QN), a diferentes concentraciones de sustrato (almidón) establecidos en el Cuadro 1, la consistencia de la quinua negra en su gelatinización es muy densa, mostrando una gelificación a menor concentración que la quinua real blanca por lo que las concentraciones de trabajo fueron diferentes, este aspecto indica una diferencia en las características físicas de los almidones de quinua real blanca y quinua real negra (C´hiara). Para el tarwi el proceso de hidrólisis a las concentraciones indicadas de oligosacaridos en harina de tarwi concluye cerca de los 60 min, los oligosacaridos contenidos en harina de tarwi sometidos a Termamyl Sc dan una producción de azúcares reductores baja por lo que resulta despreciable el someter el sustrato a la enzima a-amylasa (cuadro 5), este resultado respalda un alto contenido de oligosacaridos tipo estaquiosa, rafinosa y verbascosa [30], oligosacáridos no digeribles,

Figura 1. Doble recíproca de Lineweaver Burk de 1/V versus 1/S, para obtener Km y Vmax para Termamyl Sc., a dosis constante de Enzima, con sustrato contenido en: A. harina de QB, B. harina de QN y C. harina de T.



sin embargo se evidencia la posible presencia de malto oligosacaridos que contienen enlaces a (1-4) entre glucosas que da lugar al resultado encontrado. Los resultados, junto a las referencias encontradas, indican que el tarwi es un alimento adecuado para personas que no quieren consumir carbohidratos, en especial para los que sufren de obesidad y diabetes.

Por cada 100 g de almidón contenido en harina de quinua desengrasada se observa cerca del 26% de hidrólisis expresados en equivalente de dextrosa (DE) por efecto de Termamyl Sc, lo que se traduce en que por cada 100 g de harina de quinua real se hidroliza alrededor de 13 g de sus almidones, considerando que en ambos casos (quinua real blanca y negra) el contenido de almidones es alrededor del 50%. La enzima Termamyl Sc tiene amplia aplicación en alimentos para la licuefacción, particularmente en la producción de siropes, así como en la industria alcohólica por lo que se la eligió para realizar este estudio siendo que requiere condiciones de pH ligeramente acidas y contenido de calcio bajo (40ppm) [39], la quinua por referencias contiene cerca de 47 mg% [40], en *Lupinus mutabilis* se reporta 370 mg% [41], razón por la que se trabajó sin adicionar calcio al proceso de hidrólisis.

Manteniendo la dosis constante de enzima Termamyl Sc de 0,0252 g, a diferentes concentraciones de sustrato (Cuadro 1), se obtuvo diferentes relaciones enzima/sustrato (E/S), encontrándose la constante de Michaelis- Menten (Km) y la velocidad máxima (Vmax) por la doble recíproca de Line-Weaver Burk (Cuadro 6), según los datos encontrados, la afinidad del sustrato a la enzima en las condiciones citadas es mayor en la quinua real blanca en relación al sustrato que se encuentra en la quinua real negra.

Para cada enzima, se considera en general el Km y Vmax con sustrato libre, existen varios estudios de los parámetros cinéticos de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, se ha reportado un Km de 10,97 mg/mL y Vmax de 44,54 U/mL de la enzima aislada [42]. En el estudio de Ul-Haq *et al* (2010) a concentración fija de enzima después de su purificación de la amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* EMS-6 se obtuvo un Km de 8,3 mg/mL y 2778 U/mg min⁻¹ de Vmax con almidón de 0,1 a 1,2% [43], la comparación de Km y Vmax es difícil de realizar ya que depende del sustrato utilizado, condiciones de la reacción, cantidad de enzima, en nuestro caso no utilizamos el sustrato

Cuadro 5. Equivalentes de Dextrosa porcentual por efecto de Termamyl Sc en almidón/oligosacaridos en harina de QB, QN y T.

% ED (QB)	% ED (QN)	% ED (T)
25,0 ± 1,9	27,5 ± 1,5	2,01 ± 0,3

ED: Equivalentes Dextrosa

Cuadro 6. Valores de Km y Vmax con 0,025g de Enzima.

Muestra	Km	Vmax
QB	80,4 mg/mL	0,36 mg/mL min ⁻¹
QN	98,8 mg/mL	1,72 mg/mL min ⁻¹
T	1,3x10 ⁻³ mg/mL	4,53 mg/L min ⁻¹

libre. En otro estudio de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* inmovilizada utilizando 500 μ g/mL de proteína (enzima) se obtuvo una Vmax de alrededor de 506 U/mg y un Km aproximado de 5 μ M, consistente con el de α -amilasa libre [44]. Cuanto más pequeño el Km mayor la afinidad de la enzima siempre que se de en las mismas condiciones.

El proceso de hidrólisis para cada preparado se dio a diferentes consistencias, en el caso de las quinuas, la viscosidad es muy alta en la gelatinización, coincidiendo con datos de Ahamed *et al.* (1996) que reporta, una alta viscosidad sobre el 5% de almidón, llegando a su máximo entre el 7 y 10% [34], en nuestro estudio se evidenció que la quinua negra presenta mayor gelatinización a menor concentración de almidón, lo que indica diferencias en cuanto al tipo de almidones que constituyen estas 2 variedades, quinua real blanca (QB) y quinua real negra (QN), que podrían repercutir en la digestibilidad *in vivo*.

Con la quinua real blanca es factible trabajar hasta 10% de sustrato y con la quinua real negra hasta el 5% de sustrato por sus características de gelatinización en condiciones de laboratorio.

CONCLUSIONES

Se demostró que la aplicación de α -amilasa (Termamyl Sc) en una matriz de almidón contenido en harina de quinua desengrasada, de las variedades quinua real blanca y quinua real negra sin añadir ningún componente adicional origina cerca de 26% de azúcares reductores expresados en equivalentes de dextrosa, el efecto de α -amilasa en los oligosacáridos del Tarwi es muy bajo. Se obtuvieron los valores de

Vmax y Km a dosis constante de enzima con variación de la concentración de sustrato.

AGRADECIMIENTOS

Al programa gubernamental IDH (Impuestos de Hidrocarburos) por el financiamiento a los proyectos "Aplicación tecnológica enzimática para el desarrollo de aditivos nutricionales de fácil digestión a partir de quinua, La Paz" y "Desarrollo de una formula nutricional para personas que sufren deficiencia renal en base a quinua real y Tarwi", a la empresa de alimentos Irupana Organic Andean Food S.A. por la dotación de la materia prima orgánica certificada, y al Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés por su apoyo incondicional.

REFERENCIAS

- [1] VICENTE, J.J. El cultivo de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Estado Plurinacional de Bolivia. Revista Científica de Investigación IN-FO-INIAF, 1(7), 2016, p. 88-100.
- [2] GRAF, B.L., ROJAS-SILVA, P., ROJO, L.E., DELATORRE-HERRERA, J., BALDEON, M.E. and RASKIN, I. Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14, 2015, p. 431-445.
- [3] GRANADOS, O. La guerra por el grano de oro. Perú arrebató a Bolivia el liderato en la exportación y producción. El País [online]. 2016. https://elpais.com/economia/2016/03/31/actualidad/1459422139_795680.html [20 de septiembre 2017].
- [4] BONIFACIO, A., ARONI, G. y VILLCA, M. Catálogo etnobotánica de la Quinua Real. La Paz (Bolivia): Fundación PROINPA, 2012, 63 p.
- [5] REPO DE CARRASCO, R., y ENCINA, Z.C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Revista Sociedad Química de Perú, 74(2), 2008, p. 85-99.
- [6] PASKO, P., BARTON, H., ZAGRODZKI, P., GORINSTEIN, S. and FOLTA, M. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. Food Chemistry, 115, 2009, p. 994-998.
- [7] DINI, I., TENORE, G.C. and DINI, A. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. LWT-Food Science and Technology, 43, 2010, p. 447-451.
- [8] HWANG, T.L., WANG, C.C., KUO, Y.H., HUANG, H.C., WU, Y.C., KUO, L.M. and WU, Y.H. The hederagenin saponin smg-1 is a natural fmlp receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation. Biochemical Pharmacology, 80, 2010, p. 1190-1200.
- [9] WANG, X., LIU, R., ZHANG, W., ZHANG, X., LIAO, N., WANG, Z., LI, W., QIN, X. and HAI, C. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. Molecular and Cellular Endocrinology, 376, 2013, p. 70-80.
- [10] ZEVALLOS, V.F., ELLIS, H.J., SULIGOJ, T., HERENCIA, L.I. and CICLITIRA, P.J. Variable activation of immune response by quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) prolamins in coeliac disease. The American Journal of Clinical Nutrition, 96, 2012, p. 337-344.
- [11] GAWLIK-DZIKI, U., ŚWIECA, M., SUŁKOWSKI, M., DZIKI, D., BARANIAK, B. and CZYŻ, J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts - *In vitro* study. Food and Chemical Toxicology, 57, 2013, p. 154-160.
- [12] PASKO, P., BARTON, H., ZAGRODZKI, P., IZEWSKA, A., KROSNIAK, M., GAWLIK, M. and GORINSTEIN, S. Effect of Diet Supplemented with Quinoa Seeds on Oxidative Status in Plasma and Selected Tissues of High Fructose-Fed Rats. Plant Foods for Human Nutrition, 65, 2010a, p. 146-151.
- [13] PASKO, P., ZAGRODZKI, P., BARTON, H., CHLOPICKA, J. and GORINSTEIN, S. Effect of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa*) in Diet on some Biochemical Parameters and Essential Elements in Blood of High Fructose-Fed Rats. Plant Foods for Human Nutrition, 65, 2010b, p. 333-338.
- [14] FUENTES, F. and PAREDES, X. The state of the world's quinoa, Chapter: Nutraceutical Perspectives of Quinoa: Biological Properties and Functional Applications. New Jersey (USA): Regional Office for Latin America and Caribbean at Food and Agriculture Organization (FAO), 2015, p. 286-299.
- [15] PULVENTO, C., RICCARDI, M., LAVINI, A., D'ANDRIA, R., IAFELICE, G. and MARCONI, E.

- Field trial evaluation of two *Chenopodium quinoa* genotypes grown under rain-fed conditions in a typical mediterranean environment in south Italy. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 96, 2010, p. 407-411.
- [16] GÜENES-VERA, N., ARCINIEGA-RUIZ, O. and DÁVILA-ORTIZ, G. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37, 2004, p. 283-290.
- [17] JONES, P.J. Clinical nutrition: 7. Functional foods—more than just nutrition. *Canadian Medical Association Journal*, 166(12), 2002, p. 1555-1563.
- [18] INSTITUTO BOLIVIANO DE NORMALIZACIÓN Y CALIDAD (IBNORCA). Norma boliviana. Correspondiente a la Norma Andina NA 0038. Granos andinos - Pseudo cereales - Clasificación y requisitos. La Paz (Bolivia): 2007, 9 p.
- [19] DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERS, P.A. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 1956, p. 350-356.
- [20] ÁVILA-NÚÑEZ, R., RIVAS-PÉREZ, B., HERNÁNDEZ-MOTZELAK, R. y CHIRINOS, M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multicencias*, 12, 2012, p. 129-135.
- [21] SOUTHGATE, D.A.T. Determination of Food Carbohydrates, Elsevier Applied Science. 2 ed. Nueva York (USA): 1991, p. 132-138.
- [22] MEGAZYME. Total starch, assay procedure (amylglucosidase/α-amylase method). Maryland (USA). AOAC 996.11, AACC. Method 76-13.01, 2017, 24 p.
- [23] NIELSEN, K.R. Termamyl Scan α-amylase prepared produced by *Bacillus licheniformis* expressing a gen encoding a modified α amylase from *Bacillus estearothermophilus*. In *Enzyme regulatory Affairs NNAS*. Bagsvaerd (Dinamarca): Novo nordisk, 1999, 59 p.
- [24] OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. 20 ed. Maryland (USA): 2016, 56 p.
- [25] DINI, A., RADTRELLI, L., SATURININO, P. and SCHETTINO, O. A compositional study of *Chenopodium quinoa* Seeds. *Nahrung*, 36, 1992, p. 400-404.
- [26] US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (USDA). National nutrient database for standar reference, release 26. Nutrient Data Laboratory home page. U.S. Department of Agriculture Web site. [Online]. 2013. Disponible: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. [citado 18 de Febrero de 2017].
- [27] REPO-CARRASCO-VALENCIA, R. and ASTU-HUAMAN-SERNA, L. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber, and other functional components. *Ciencia e Tecnología de alimentos*, 31(1), 2011, p. 225-230.
- [28] SCHNEEMAN, B.O. Physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effect. *Food Technology*, 40, 1986, p. 104- 109.
- [29] ORTEGA-DAVID, E., RODRÍGUEZ, A., DAVID, A. y ZAMORA-BURBANO, A. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59(1), 2010, p. 111-118.
- [30] GROSS, R., VON BAER, E., KOCH, F., MARQUARD, R., TRUGO, L. and WINK, M. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) whit low alkaloid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1, 1988, p. 353-361.
- [31] TAPIA, M. El Tarwi lupino andino. Tarwi, tauri o chocho. *Lupinus mutabilis* sweet. 1 ed. Lima (Perú): Fondo Italo Peruano, 2015, 25 p.
- [32] SCHOENEBERGER, H., GROSS, R., CREMER, H.D. and ELMADFA, I. Composition and Protein Quality of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Nutrition*, 112, 1982, p. 70-76.
- [33] SCHOENEBERGER, H., GROSS, R., CREMER, H.D. and ELMADFA, I. The protein quality of lupins (*Lupinus mutabilis*) alone and in combination with other protein sources, *Plant Foods of Human Nutrition*, 32(2), 1983, p. 133-143.
- [34] AHAMED, N.T., SINGHAL, R.S., KULKARNI, P.R. and MOHINDER, P. A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, 19, 1998, p. 61-70.
- [35] VEGA-GALVEZ, A., MIRANDA, M., VERGARA, J., URIBE, E., PUENTE, L. and MARTINEZ, E.A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2010, p. 2541-2547.
- [36] ARZAPALO, D., HUAMÁN, K., QUISPE, M. y ESPINOZA, C. Extracción y caracterización del almidón de tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) negra collana, pasankalla roja

- y blanca Junín. Revista de la Sociedad Química del Perú, 81(1), 2015, p. 44-54.
- [37] OGUNBENGLE, H.N. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. International journal of food sciences and nutrition, 54(2), 2003, p. 153-158.
- [38] REPO-CARRASCO, R., ESPINOZA, C. and JACOBSEN, S.E. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International, 19, 2003, p. 179-189.
- [39] GONZALES, J.A., ROLDAN, A., GALLARDO, M., ESCUDERO, T. and PRADO, F.E. Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: *Chenopodium quinoa* ('quinoa'). Plant foods for human nutrition, 39, 1989, p. 331-337.
- [40] KONISHI, Y., HIRANO, S., TSUBOI, H. and WADA, M. Distribution of Minerals in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68, 2004, p. 231-234.
- [41] ITALIA. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). Simposio Regional del chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis*). Quito (Ecuador): 2016, 25 p.
- [42] ADEYANJU, M.M., AGBOOLA, F.K., OMFUVBE, B.O., OYEFUGA, O.H. and ADEBAWO, O.O. A thermostable extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis* isolated from cassava steep wáter. Biotechnology Letters, 6, 2007, p. 473-480.
- [43] UL-HAQ, I., MOHSIN-JAVED, M., UZMA, H. and ADNAN, F. Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* mutant. Pakistan Journal of Botany, 42(5) 2010, p. 3507-3516.
- [44] RASIAH, I. and REHM, B. One-Step Production of Immobilized α -Amylase in Recombinant *Escherichia coli*, *ppl*. Environmental Microbiology, 75(7), 2009, p. 2012-2016.

Phenotypic and molecular characterization of *Fusarium spp.* coming from sesame production zone in Venezuela

Caracterización fenotípica y molecular de *Fusarium spp.* proveniente de la zona de producción de ajonjolí en Venezuela

Caracterização fenotípica e molecular da *Fusarium spp.* origem da área de produção de gergelim na Venezuela

GILBERTO ALVARADO¹, HERNÁN LAURENTIN², PASTORA QUERALES³,
DILCIA ULACIO⁴, ANA GÓMEZ⁵, NAILLETH MÉNDEZ⁶

Recibido para evaluación: 15 de Mayo de 2018.

Aprobado para publicación: 3 de Octubre de 2018.

- 1 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Departamento de Ciencias Biológicas. Ingeniero Agrónomo. Barquisimeto, Venezuela
- 2 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Departamento de Ciencias Biológicas. PhD. en Ciencias Agrícolas. Barquisimeto, Venezuela.
- 3 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Departamento de Ciencias Biológicas. Doctora en Ciencias. Barquisimeto, Venezuela.
- 4 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Departamento de Ciencias Biológicas. Doctora en Fitopatología (†). Barquisimeto, Venezuela.
- 5 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Departamento de Ciencias Biológicas. Técnico Superior Universitario Agroindustrial. Barquisimeto, Venezuela.
- 6 Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Departamento de Ciencias Biológicas. Técnico Superior Universitario Agroindustrial. Barquisimeto, Venezuela.

Correspondencia: hlaurentin@ucla.edu.ve

ABSTRACT

Sesame is an important crop in tropical areas, which is seriously affected by soil-borne fungi such as *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* sp. In order to identify and characterize *Fusarium* spp. causing disease in sesame plants in the field, ten isolates were obtained. Eleven distinctive taxonomic traits were determined, and additionally growth rate was measured in Petri dishes. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) by means of five primers was also performed. Three *Fusarium* species were reported: *Fusarium oxysporum* (2 isolates), *Fusarium solani* (7 isolates) and *Fusarium semitectum* (1 isolate). Previous reports indicate that sesame is affected just by *F. oxysporum* f. sp. *sesami*, only one previous report indicate that also *F. solani* causes fusarium wilt in this crop. In vitro growth rates were within a range of 0,21-0,29 mm h⁻¹, with no trend according to the species. Growth of one of the isolates of *F. oxysporum* was statistically ($P<0,05$) faster than the others. Fifty RAPD bands (92% polymorphic) were not able to differentiate the three *Fusarium* species. Similarity Jaccard coefficient ranged between 0,15 and 0,47 with an average of 0,32.

RESUMEN

El ajonjolí es un cultivo importante en regiones tropicales, el cual es afectado por hongos del suelo como *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium* sp. Con el objetivo de identificar y caracterizar a *Fusarium* spp. como causante de pudrición en plantas de ajonjolí en campo, se obtuvieron diez aislados. Once características distintivas a nivel taxonómico se determinaron sobre los diez aislados, y adicionalmente se midió la velocidad de crecimiento en cápsulas de Petri. A nivel molecular, la caracterización de los diez aislados, se desarrolló utilizando la técnica molecular de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) mediante el uso de cinco cebadores o "primers". Se identificaron tres especies de *Fusarium oxysporum* (2 aislados), *Fusarium solani* (7 aislados) y *Fusarium semitectum* (1 aislado). Investigaciones anteriores al presente trabajo indican que el ajonjolí es solo afectado por *F. oxysporum* f. sp. *sesami*, solo un reporte previo indica que también *F. solani* causa la pudrición de *Fusarium* en este cultivo. La velocidad de crecimiento in vitro se ubicó en un rango entre 0,21-0,29 mm h⁻¹, sin ningún patrón identificable de acuerdo a la especie. El crecimiento de uno de los aislados de *F. oxysporum* fue estadísticamente ($P<0,05$) más rápido que los otros aislados evaluados. Cincuenta bandas RAPD (92% polimórficas) no pudieron diferenciar las tres especies identificadas de *Fusarium*. El coeficiente de similitud de Jaccard estuvo entre 0,15 y 0,47 con un promedio de 0,32.

RESUMO

O gergelim, uma cultura importante em regiões tropicais é seriamente afetada pelos fungos do solo *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* sp. A fim de identificar e caracterizar *Fusarium* spp. causadores da podridão em plantas de gergelim no campo, dez isolados foram obtidos. Vários caracteres taxonômicos distintos foram determinados nos dez isolados, e a taxa de crescimento

KEYWORDS:

Fusarium wilt, *F. solani*,
F. oxysporum, *F. semitectum*, RAPD.

PALABRAS CLAVE:

Pudrición por *Fusarium*, *F. solani*,
F. oxysporum, *F. semitectum*, RAPD.

PALAVRAS-CHAVE:

Podridão de *Fusarium*, *F. solani*,
F. oxysporum, *F. semitectum*, RAPD.

em placas de Petri foi medida adicionalmente. Para mais detalhes da caracterização dos dez isolados, utilizou-se a técnica molecular de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), através de cinco iniciadores ou "primers". Foram identificadas sob critério morfológico três espécies; *Fusarium oxysporum* (2 isolados), *Fusarium solani* (7 isolados) e *Fusarium semitectum* (um isolado). Relatórios anteriores indicam que o gergelim é afetado apenas por *F. oxysporum* f. sp. *sesami*, no entanto, um relatório anterior indica que *F. solani*, também pode causar a podridão de fusarium nesta cultura. A taxa de crescimento in vitro foi na faixa entre 0,21- 0,29 mm. h⁻¹, sem qualquer padrão identificável de acordo com a espécie. O crescimento de um dos isolados de *F. oxysporum* foi estatisticamente ($P < 0,05$) mais rápido que os outros isolados avaliados. Cinquenta bandas de RAPD (92% polimórficas) não conseguiram diferenciar as três espécies de *Fusarium* identificadas morfológicamente. O coeficiente de similaridade de Jaccard foi entre 0,15 e 0,47 com uma média de 0,32.

INTRODUCTION

Sesame is one of the oldest oil crops which grows in tropical and subtropical areas [1]. Sesame oil is highly appreciated by consumers because of good balance of fatty acids [2] and also because of the high antioxidant content [3], which is desirable for human health and for shelf-life.

Sesame, as any other crop, has several biological constraints at the field such as insects pest (e.g. whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius) [4], and pathogenic fungi (e.g. *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami*) [5]. *Fusarium oxysporum* is a soil-borne fungus which survives as saprophytic, and affects many crops [6]. When conditions are favorable, fungus mycelium goes into the host plant through the roots until xylem, affecting plant water supply. *F. oxysporum* is considered a complex, and within this complex, more than 150 host-specific *Forma specialis* have been described [7].

Sesame is one of these many crops that may be affected by *F. oxysporum*, and specific *Forma specialis* of the fungus is *F. oxysporum* f.sp. *sesami*. According to Pineda (2002) [8], plants affected by *F. oxysporum* f. sp. *sesami* are recognized by leaf yellowness on one side of the plant, and subsequent appearance of a brown stripe

and pink powder along the stem (fructification structures of the fungus); in plantlets, disease is identified by wet rot at the neck, plant wilt, and sudden death. Symptoms described are consequence of fungus colonization inside of vascular system in roots and stem.

Strategies design of integrated pathogen management implies knowledge of fungus epidemiology and attributes of population, and these studies should be based on a correct identification of the pathogen. For identifying *Fusarium* species, taxonomic system considers morphological attributes divided in primary and secondary traits. Primary attributes are chlamidospore presence, size and shape of macroconidia, and microconidia; secondary attributes are colony color and morphology, and sporodochium [9, 10].

The objective of this research was to characterize at morphological and molecular level isolates of *Fusarium* spp. coming from symptomatic tissue from sesame production area in Venezuela, in order to have a general idea about genetic diversity of this fungus affecting the crop.

METHODS

Fungus isolation

In sesame commercial fields, infected plants showing the typical symptoms of *Fusarium* wilt were identified. Pieces of about 1 cm² coming from stems of these plants were washed with sodium hypochlorite (1%) and put into Petri dishes containing water agar. Petri dishes were incubated at room temperature (20-28°C) for 5 days, and hyphae tips of typical *Fusarium* mycelia was transfer to new Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), which also was incubated at room temperature for 5 days. Ten Petri dishes containing *Fusarium* were obtained, and from them, monosporic cultures were prepared by means of addition of 20 µL of conidia suspension in new Petri dishes containing water agar, which was incubated for 24 h. Germinated conidia were identified under microscope, and only one was transferred to a new Petri dish containing PDA, which was incubated for 5 days at room temperature. Ten agar disks for each isolate coming from each of the ten Petri dishes were conserved in sterilized water according to Figueiredo (1967) [11].

Morphological characterization

A single agar disk containing mycelium of *Fusarium* sp. was transferred to SNA medium (synthetischer nährstoffarmer agar, 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% $NaNO_3$, 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05% KCl, 0,02% glucose, 0,2% sucrose and 2% agar) prepared into a Petri dish containing a single piece of carnation (*Dianthus cariphylus*) leaf. It was replicated twice for each isolate. Morphological characterization was carried out by using traits proposed by Nelson *et al.* (1983, 1994) [12, 9]. Taxonomic identification of each isolate was carried out on mycelium growing for 7 days, by using the morphological traits proposed by Leslie and Summerell (2006) [13]: conidiophore, type of conidigenous cells (monophialide or polyphialide), microconidia (shape, septum presence, arrangement on conidigenous cell), macroconidia (shape, septa number, origin), chlamydospores (number, shape, arrangement on mycelium). Growth rate was also determined for each isolate. A single piece of 1 cm² of potato dextrose agar taken from the edge of 48 h fungi cultures, was placed at the center of a Petri dish. It was replicated four times for each isolate. Colony diameter was measured every 12 h until fungus reached the edge of the dish. Colony area was calculated and data subjected to analysis of variance as a factorial design (isolate with 10 levels, measuring time with 10 levels, and interaction). When statistical differences were detected, Tukey test was performed for mean comparison ($P < 0,01$).

Molecular characterization

Each isolate was grown for 7 days on PDA, and mycelium was taken for DNA extraction, which was carried out following the Hoisington *et al.* (1994) [14] procedure. DNA was purified with 10 mg mL⁻¹ of RNAase, and concentration was estimated by visualization in agarose gel (0,8%) under UV light, after electrophoresis (30 minutes, 100 V) and staining with ethidium bromide. Concentration of all DNAs extracted was standardized in approximately 10 mg mL⁻¹. DNA was amplified in a thermal cycler Perkin Elmer 2400 using 5 primers (OPA10, sequence GTGATCGCAG, OPM-1 sequence GTTGGTGGCT, OPO-16 sequence TCGGCGGTTC, OPP-1 sequence GTAGCACTCC, OPP-17 sequence TGACCCGCCT), using the same procedure of Zamani *et al.* (2004) [15]. PCR products were subjected to electrophoresis on agarose gels (1,5%) for 80 minutes at

100 V, and were visualized under UV light after staining with ethidium bromide. All PCR reactions were carried out twice. Data was recorded as presence or absence of bands for each isolate (presence of bands was considered when it appeared in both PCR reactions), and Jaccard similarity coefficient was calculated between each pair of isolates. Coordinate analysis was used for visualizing genetic relationship among isolates. For that, correlation coefficient was calculated between all pairs of bands, afterward matrix was doubly centered and eigenvalues and eigenvectors were calculated, which were projected in a two dimension space. Analyses were performed with NTSYS pc v. 2.02.

RESULTS

Three *Fusarium* species were identified from the ten isolates according to Leslie and Summerell (2006) [13] and Nelson *et al.* (1994) [9] criteria. Two isolates were identified as *Fusarium oxysporum* because of the presence of oval microconidia, most of them two-celled in false head on a short monophialide which in most of the cases was close to another long monophialide; macroconidia had 3-5 septa, formed on a sporodochium; chlamydospores were terminal or intercalar, smooth and ornamented. In the culture this species was characterized by abundant white (slightly pink) mycelium in both surface and deep. Seven isolates were identified as *Fusarium solani*, which had white mycelium, hyaline two-celled microconidia formed on a long and lonely monophialide in false head; macroconidia had 3-5 septa on branched conidiophore; rounded to oval and slightly wrinkled chlamydospores were intercalar. This species was characterized by abundant and white mycelium. One isolate was identified as *Fusarium semitectum*, which presented an uniform slightly pink color in the mycelium; many branched conidiophores with monophialialide in shape of V, with many 3-5 septa macroconidia; sporodochium of pink color having few chlamydospores and macroconidia.

Growth rate was statistically different ($P < 0,05$) for interaction Isolate x Measuring Time. Figure 1 displays the growth rate for each isolate during 5 days. Table 1 shows that covered area in Petri dishes at fifth day resulted also in statistical differences ($P < 0,05$) among isolates, according to Tukey test.

Molecular characterization by means of RAPD resulted in 50 bands, 46 of them (92%) polymorphic. Table 2 indicates number of bands obtained for each primer.

Jaccard coefficient for the 45 possible pairwise comparison between the 10 isolates had an average of 0,32; in a range between 0,15 (*Fusarium oxysporum* 001 and *Fusarium solani* 4) and 0,47 (*Fusarium oxysporum* 002 and *Fusarium semitectum*). Three-dimension plot generated by principal coordinates analysis (Figure 2), according to the eigenvalues, explained 58% of variation.

Fusarium oxysporum f. sp. *sesami* has been reported as the causal agent of fusarium wilt in sesame (*Sesamum indicum* L.) [16-19], however, this research reports other species associated to this disease. Isolates of the fungus were obtained from sesame stem tissue presenting symptoms of the disease, therefore, all the species identified in this research should be recognized as causal agents, or at least to be present as opportunists in the lesions caused by *Fusarium* sp. Sesame is sown in Venezuela as rotation crop to maize in the dry-season, as well as sorghum and sunflower. *F. semitectum* has been reported as a pathogen to sorghum, but *F. solani* is not a pathogen to sunflower or sorghum; therefore, maybe *F. semitectum* could be considered as occasional pathogen to sesame, it could attack sorghum and occasionally sesame, but *F. solani* seems to be nowadays a frequent pathogen to sesame, it does not have another host plant in the area. Li *et al.* (2012) [20] reported that fusarium wilt in sesame is not only caused by *F. oxysporum* f.sp. *sesami*, but also by *Fusarium solani*, however they indicate pathogenicity is stronger for *F. oxysporum* than for *F. solani*. These results agree this study in having evidence that fusarium wilt in sesame is caused by *F. oxysporum* and *F. solani*. Results of the present research indicate that also *F. semitectum* may be present in fusarium wilt lesions in sesame. Recent reports indicate that also *F. proliferatum* may attack sesame [21].

In the case that *Fusarium* species identified on the sesame tissue are not opportunists, these results must be taken into account to consider two options: coevolution plant-pathogen could be permitting to some *Fusarium* species different of *F. oxysporum*, to take advantage of sesame plants to get the necessary nutrients; it means to cause disease on sesame plants. The other option is that fusarium wilt is caused by a *Fusarium* complex, and maybe aggressiveness will depend on which fungus species are invol-

Table 1. Tukey test for covered area (cm²) in Petri dishes after five days for ten *Fusarium* isolates.

Isolate	Mean (covered area in cm ²)
<i>Fusarium oxysporum</i> (001)	9,30 a
<i>Fusarium solani</i> (001)	7,84 b
<i>Fusarium semitectum</i>	7,65 b
<i>Fusarium solani</i> (002)	7,60 b
<i>Fusarium solani</i> (006)	7,59 b
<i>Fusarium solani</i> (003)	7,59 b
<i>Fusarium oxysporum</i> (002)	6,33 c
<i>Fusarium solani</i> (005)	6,28 c
<i>Fusarium solani</i> (004)	5,28 c
<i>Fusarium solani</i> (007)	5,24 c

Note: means followed by the same letter do not differ statistically (P<0,05)

Table 2. Number of RAPD bands obtained for each primer used in a study of 10 *Fusarium* isolates.

Primer name	Number of bands	Number of polymorphic bands	Number of monomorphic bands
OPA-10	7	3	4
OPM-01	11	11	0
OPO-16	12	12	0
OPP-01	4	4	0
OPP-17	16	16	0
Total	50	46	4

ved. In any case, it is remarkable that two *Fusarium* species of the four most important *Fusarium* species in plant pathology [22] may attack *Sesamum indicum*.

In vitro growth rate of the isolate *Fusarium oxysporum* 001 was higher than the other isolates, which could be indication of higher ability than the other isolates for colonizing plant tissue in less time, it means, more aggressiveness. When growth rate is expressed linearly, isolates of *F. oxysporum* had a rate between 0,24 and 0,29 mm h⁻¹, lower than other previously reported in the same culture medium (PDA) and similar incubation temperature, such as 0,59 mm h⁻¹ [23] for *F. oxysporum* strain isolated from the soil, 1,11 mm h⁻¹ [20] for *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*, and 0,53 mm h⁻¹ [24] for *F. oxysporum* causing soybean root rot. Isolates of *F. solani* resulted in a growth rate between 0,22 and 0,26 mm h⁻¹, similar to the reported by Rehman *et al.* (2012) [25] for *F. solani* isolated from citrus plants.

Figure 1. Area covered by ten *Fusarium* isolates in Petri dishes.

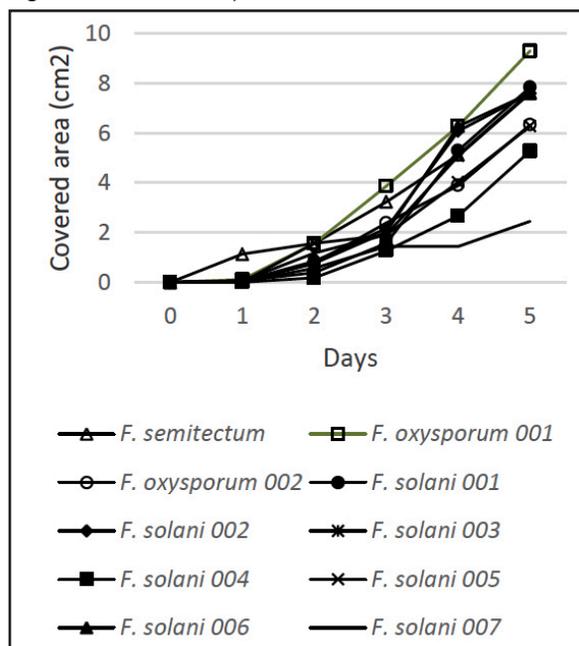
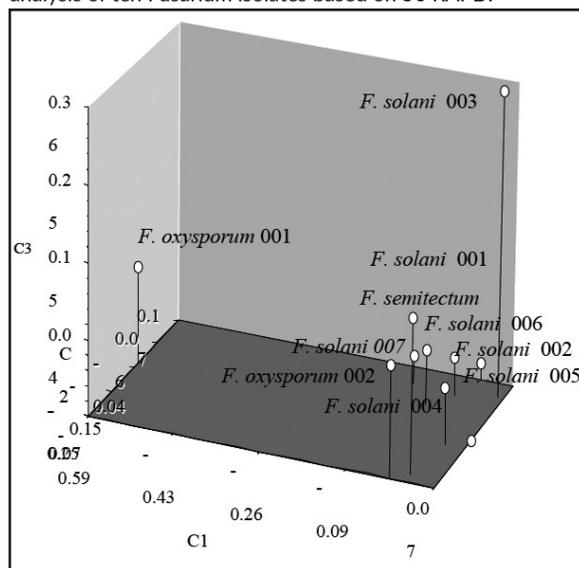


Figure 2. Three-dimension plot from principal coordinates analysis of ten *Fusarium* isolates based on 50 RAPD.



Single isolate of *F. semitectum* had a rate of 0,26 mm h⁻¹, similar to 0,27 mm h⁻¹ reported by Li (2011) [26] when determined growth rate for an isolate coming from soybean. Differences in growth rate of *F. oxysporum* isolates evaluated in this research as compared to the other used in previous research may be explained by a broad genetic diversity of the species,

moreover when they are other *Forma specialis* or at least other isolates. In Venezuelan sesame production the main pathogen according to the frequency of disease at fields is *Macrophomina phaseolina*. Martínez-Hilders and Laurentin (2012) [27] determined for this fungus an *in vitro* average growth rate of 0,80 mm h⁻¹, higher than the one found for *F. oxysporum*. This could be the explanation why *F. oxysporum* (or *Fusarium* complex) appears less frequently than *M. phaseolina*, maybe *M. phaseolina* has more ability to colonize sesame plants faster than *F. oxysporum*.

Ten bands per primer were obtained in this molecular characterization, which is lower than the 13 per primer reported by Luna *et al.* (2004) [28] when characterized 41 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* using 5 primers; however results of the present research are similar to the reported in cucumber [29] (11 band per primer when characterized 106 isolates of *F. oxysporum* from cucumber) and pigeonpea [30] (9 bands per primer when characterized 14 isolates of *F. oxysporum* and *F. udum*). High polymorphic ratio (higher than 85%) was a common factor for all these researches and the present one. The fifty bands produced by PCR reactions were not enough to discriminate among isolates according to the species. Isolate *Fusarium oxysporum* 002 has more similarities with *F. solani* isolates than with the other isolate of *F. oxysporum*, or isolate *Fusarium solani* 006 has more similarities with *F. semitectum* than with the other isolates of *F. solani*. RAPD is a technique based on a random sampling in the DNA, therefore there is a high probability that the 50 bands are not related to the DNA sections responsible of the species differentiation. However, results of the high variability of *F. oxysporum* as compared to *F. solani* may be indicating a long coevolution story with sesame, which results in a large genetic differentiation within the species, and may be this is not the case for *F. solani*.

CONCLUSION

Fusarium spp. isolates coming from sesame production area were different at morphological level, which allow to get identification of three species: *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. semitectum*. Growth speed was not different among species, but it was statistically higher for one isolate. Molecular characterization was not able to group isolates according to species;

probably more primers should be used to get some discrimination among species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by CDCHT (Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico) of Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado by means of the project 033-AG-2009.

REFERENCES

- [1] AHIRWAR, K., PANDA, S. and JYOTISHI, A. Optimisation of sesame (*Sesamum indicum* L.) production through integrated nutrient management. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6, 2017, p. 1701-1707.
- [2] THAKU, V., PAROHA, S. and MISHRA, R. Chemical characterization and fatty acid composition of different sesame varieties. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6, 2017, p. 1936-1943
- [3] BODOIRA, R., VELEZ, A., ANDREATTA, A., MARTINEZ, M. and MAESTRI, D. Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under sub-critical conditions. *Food Chemistry*, 237, 2017, p. 114-120.
- [4] PANDAY, A., RAJANI, B., SURABHI, J. and RANGANATHA, A. Efficacy and economics of different insecticidal treatments for the management of major sucking insect pests of sesame. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6, 2018, p. 1247-1252.
- [5] KHAMARI, B., BEURA, S., SUSHREE, A. and MONALISA, S. Assessment of combined effect of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* on disease incidence of sesame (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2017, p. 1135-1139.
- [6] ORTONEDA, M., GUARRO, J., MADRID, M., CARACUEL, Z., RONCERO, M.I., MAYAYO, E. and DI PRIETO, A. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and Immunity*, 72, 2004, p. 1760-1766.
- [7] RANA, A., SAHGAL, M. and JOHRI, B. *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant-host interaction. In: Satyanarayana T., Deshmukh S., Johri B. (eds) *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Singapore (Singapore): Springer, 2017, p. 159-199.
- [8] PINEDA, J. II Curso sobre producción de ajonjolí, soya y otras leguminosas. Caracas (Venezuela): Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, 2002, 179 pp.
- [9] NELSON, P.E., DIGNAN, M.C. and ANAISSIE, E.J. *Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of Fusarium species*. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 1994, p. 479.
- [10] WINDELS, C.E. *Fusarium*. In: Singleton L, Mikhail J, Rush C (eds.) *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. Minnesota (USA): American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1992, p. 115-128.
- [11] FIGUEIREDO, B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33, 1967, p. 9-12.
- [12] NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A. and MARASAS, W. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania (USA): Pennsylvania State University Press, 1983, 145 p.
- [13] LESLIE, J.F. and SUMMERELL, B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*. Sidney (Australia): Blackwell Publisher, 2006, 120 p.
- [14] HOISINGTON, D., KHARIALLAH, M. and GONZALES, D. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. 2 ed. Mexico D.F (México): 1994, 73 p.
- [15] ZAMANI, M., MOTALLERI, N. and ROSTAMIAN, A. Characterization of iranian isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of RAPD analysis, virulence and vegetative compatibility. *Journal of Phytopathology*, 152, 2004, p. 449-453
- [16] EL-BRAMAWY, M. Inheritance of resistance to Fusarium wilt in some sesame crosses under field conditions. *Plant Protection Sciences*, 42, 2006, p. 99-105.
- [17] SILME, R. and CAGIRGAN, M. Screening for resistance to Fusarium wilt in induced mutants and world collection of sesame under intensive management. *Turkish Journal of Field Crops*, 15, 2010, p. 89-93.

- [18] JYOTHI, B., ANSARI, N., VIJAY, Y., ANURADHA, G., SARKAR, A., SUDHAKAR, R. and SIDDIQ, E. Assessment of resistance to Fusarium wilt disease in sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm. *Australasian Plant Pathology*, 40, 2011, p. 471-475.
- [19] FALLAHPORI, A., AMINIAN, H. and ESMAILZADEH, S. Evaluation of peroxidase activity in two resistant and susceptible sesame germplasms to Fusarium damping-off caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami*. *Iran Journal of Plant Pathology*, 49, 2013, p. 35-36.
- [20] LI, D., WANG, L., ZHANG, Y., LV, H., QI, X., WEI, W. and ZHANG, X. Pathogenic variation and molecular characterization of Fusarium species isolated from wilted sesame in China. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 2012, p. 149-154.
- [21] GAGOSH, B., WOODWARD, S, MUR, L., AKRAM, A., ARSHAD, M., SAQULAN, S. and AKHUND, S. Identification and pathogenicity of Fusarium species associated with sesame (*Sesamum indicum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 2018, p. 128-135.
- [22] AOKI, T., O'DONNELL, K. and GEISER, D. Systematics of key phytopathogenic Fusarium species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 2014, p. 189-201.
- [23] EL-ZAHER, E., MAHMOUD, Y. and ALY, M. Effect of different concentrations of phenol on growth of some fungi isolated from contaminated soils. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2011, p. 1384-1392.
- [24] TAO, X., SHANG, B., DONG, H., CHEN, Y. and XIN, H. Effect of digestate from swine manure digester on in vitro growth of crop fungal pathogens: a laboratory study. *Transactions of the ASABE*, 57, 2014, p. 1803-1810.
- [25] REHMAN, A., REHMAN, A., JAVED, N., ULLAH, A. and MEHBOOB, S. Toxin production by *Fusarium solani* from declining citrus plants and its management. *African Journal of Biotechnology*, 119, 2012, p. 2199-2203.
- [26] LI, Y. Biology characteristic determination of *Fusarium semitectum* in soybeans. *Advances in Biomedical Engineering*, 3-5, 2006, p. 76-80.
- [27] MARTÍNEZ-HILDERS, A. y LAURENTIN, H. Caracterización fenotípica y molecular de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. proveniente de la zona de producción de ajonjolí en Venezuela. *Bioagro*, 24, 2012, p. 187-196.
- [28] LUNA, P.A., SILVA, R., MARBÁN, M. y VALADEZ, M. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend:FR. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD's en el Bajío México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 2004, p. 44-51.
- [29] VAKALOUNAKIS, D. and FRAGKIADAKIS, G. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology*, 89, 1999, p. 161-168.
- [30] DATTA, J. and LAL, N. Application of molecular markers for genetic discrimination of Fusarium wilt pathogen races affecting chickpea and pigeonpea in major regions of India, *Cellular and Molecular Biology*, 58, 2012, p. 55-65.

Detección molecular de depredación
de *Hypothenemus hampei* (coleoptera:
curculionidae) por *Wasmannia auropunctata*
(hymenoptera: formicidae)

Predation molecular detection on
Hypothenemus hampei (coleoptera:
curculionidae) by *Wasmannia auropunctata*
(hymenoptera: formicidae)

Detección molecular de depredação
de *Hypothenemus hampei* (coleoptera:
curculionidae) por *Wasmannia auropunctata*
(hymenoptera: formicidae)

ELISABETH JIMÉNEZ-CARMONA¹, INGE ARMBRECHT², RODRIGO QUINTERO³,
JAMES MONTOYA-LERMA⁴, LUIS MIGUEL CONSTANTINO⁵

Recibido para evaluación: 22 de Octubre de 2017.

Aprobado para publicación: 29 de Noviembre de 2018.

- 1 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). PhD. Cali, Colombia.
- 2 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). PhD. Cali, Colombia.
- 3 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). Biólogo. Cali, Colombia.
- 4 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). PhD. Cali, Colombia.
- 5 CENICAFE, dpto. de Entomología. Msc. Chinchiná Colombia.

Correspondencia: inge.armbrecht@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Se conoce poco sobre redes tróficas implicando hormigas que depredan broca del café. Con el objetivo de evaluar la interacción depredador-presa usando análisis molecular se usó dicha tecnología para identificar la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en el contenido estomacal de la hormiga *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). Colonias artificiales de *W. auropunctata* fueron alimentadas en condiciones de laboratorio con broca, mientras los controles fueron alimentadas con presas distintas. Se observó amplificación de los tres cebadores en el 96,59% de las muestras de las hormigas con consumo de broca, sin embargo la amplificación también se presentó en el 83,72% de las muestras sin consumo, detectando la unión de los cebadores evaluados a sitios inespecíficos de las hormigas control. Se encontró que los cebadores no fueron específicos para broca. Diferentes estudios argumentan que el ADN del depredador puede presentarse en exceso en comparación al ADN de la presa y, en consecuencia, las secuencias menos concentradas de la presa a menudo no amplifican y los cebadores tienden a unirse a regiones inespecíficas del ADN del depredador, generando falsos positivos. Se concluye que el análisis molecular representa una herramienta adicional para detectar depredación en este sistema pero que aún requiere mayor especificidad.

ABSTRACT

There is a small knowledge about trophic webs implying ants that predate coffee berry borer. With the objective of evaluating the predator-prey interaction using molecular analysis, this technology was used to identify the coffee berry borer (CBB) (*Hypothenemus hampei*) in the gut contents of the ant *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). Artificial colonies of *W. auropunctata* were fed under laboratory conditions with CBB, while controls were fed with a different prey. Amplification of the three primers was observed in 96,59% of the ant samples with CBB consumption, however the amplification was also present in 83,72% of the samples without consumption, which means that the primers attached to non-specific sites of control ants. We found that the primers were not specific to the CBB. Various studies argue that DNA from predator may be in excess compared to DNA from the prey and, as a consequence, less concentrated sequences of prey often do not amplify and primers tend to bind to non-specific regions of the predator DNA, generating false positives. It is concluded that the molecular analysis represents an additional tool to detect predation on this system but still requires to be more specific.

RESUMO

Pouco se sabe sobre redes tróficas que implicam formigas que depredam a broca do cafeiro. Com o objetivo de avaliar a interação predador-presa utilizando o análise molecular, a referida tecnologia foi utilizada para identificar a broca do café (*Hypothenemus hampei*) no conteúdo estomacal da formiga *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). As colônias artificiais de *W. auropunctata* foram alimentadas em condições laboratoriais com broca, enquanto os controles foram alimentados com diferentes presas. A am-

PALABRAS CLAVE:

Enemigos naturales, Control biológico, Plaga del café.

KEY WORDS:

Natural enemies, Biological control, Coffee pest.

PALAVRAS CHAVE:

Inimigos naturais, Controle biológico, Praga do cafeiro.

plificação dos três iniciadores foi observada em 96,59% das amostras de formigas com consumo de broca, no entanto, a amplificação também estava presente em 83,72% das amostras sem consumo, detetando a ligação dos iniciadores avaliados para locais não específicos de formigas controle. Descobrimos que os iniciadores não eram específicos da broca. Diferentes estudos argumentam que o DNA predador pode estar em excesso em comparação com o DNA da presa e, como consequência, as sequências de presas menos concentradas geralmente não amplificam e os iniciadores tendem a se ligar a regiões não específicas de o DNA do predador, gerando falsos positivos. Conclui-se que a análise molecular representa uma ferramenta adicional para detectar predação neste sistema, mas ainda requer ser mais específica.

INTRODUCCIÓN

Las hormigas han sido reportadas como enemigos naturales de una gran variedad de artrópodos. Ellas tienen el potencial de ejercer una presión significativa sobre sus presas herbívoras, ya que exhiben una amplia gama de preferencias alimentarias y, debido a su comportamiento y carácter social, pueden consumir especies de todos los tamaños [1,2]. Su ubicuidad en áreas urbanas, boscosas y agrícolas, junto con sus hábitos alimenticios diversos, sugiere que sus patrones de consumo podrían tener efectos importantes para la dinámica de la red alimentaria. Además, varias especies de hormigas son depredadoras importantes de plagas agrícolas tropicales tan diversas como la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) [7], y de otras plagas como la mosca de la fruta oriental *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

(Diptera: Tephritidae) en cítricos [3] y sobre ninfas de *Idioscopus nitidulus* (Walker) (Hemiptera: Cicadellidae) en mango [8]. Sin embargo, sus interacciones dentro de las redes alimenticias de muchos otros sistemas siguen siendo poco claras. Para caracterizar mejor el impacto de las hormigas como depredadores, es necesario mapear la estructura de sus redes alimenticias y establecer patrones generales de consumo. Los métodos utilizados para caracterizar las redes alimenticias de las hormigas han sido a menudo aproximados y vagos. Los ensayos visuales de forrajeo de hormigas presentan una extrema dificultad en su ejecución, especialmente en las especies forra-

jas nocturnas, y proporcionan estimaciones relativamente poco confiables de la depredación.

El análisis molecular del contenido estomacal, un método *post-mortem* de identificación de enlaces tróficos, es altamente sensible a la identificación de ADN específico de presa dentro del estómago de los depredadores [4] y podría ser una excelente herramienta para identificar los vínculos tróficos y estimar los patrones de depredación de las hormigas sobre especies claves de presas como *Hypotenemus hampei*.

Para la broca del café, estudios anteriores han utilizado el análisis molecular del contenido intestinal de varios insectos depredadores como *Karnyothrips flavipes* Jones (Thysanoptera: Phlaeothripidae),

Cathartus quadricollis (Guér.) (Coleoptera: Silvanidae) y *Leptophloeus* sp. (Coleoptera: Laemophloeidae) confirmando el papel depredador de estos insectos en granos de café brocados [5]. Los cebadores del gen COI específicos de especie diseñados para *H. hampei* demostraron tener un alto grado de especificidad para ADN de broca y no produjeron ningún producto de PCR a partir de ADN molde de otros insectos asociados a los agroecosistemas de café [9]. Igualmente, mediante ensayos de alimentación en laboratorio, Jaramillo y colegas [9] demostraron que un fragmento de 185 pb de ADN de COI de *H. hampei* podría permanecer intacto durante un máximo de 30 h en el tracto digestivo de *K. flavipes*. Finalmente, en muestreos de campo los autores encontraron que, en total, 3.327 *K. flavipes* emergieron de 17.792 frutos infestados con *H. hampei* recogidos entre abril y septiembre de 2008. A lo largo de la temporada, el 8,3% de *K. flavipes* dio positivo para ADN de *H. hampei*, aunque a veces esta cifra se acercó al 50%. Estos resultados revelaron que la disponibilidad de las presas se correlacionó significativamente con el consumo de éstas, lo que indica el impacto potencial sobre las poblaciones de *H. hampei*. Con los anteriores antecedentes y dado que varias especies de hormigas han sido encontradas depredando la broca, el presente estudio evaluó la especificidad de un par de cebadores del gen mtCOI para identificar broca del café haciendo un análisis molecular del contenido intestinal de hormigas alimentadas con broca empleando el método propuesto en la literatura.

MÉTODO

Establecimiento y selección de las hormigas depredadoras en laboratorio

Se realizó un análisis exploratorio para determinar cuáles géneros de hormigas eran los más abundantes en el campo y los más apropiados para criar en laboratorio y con mayor potencial depredador. Para esto se establecieron colonias artificiales usando cajas plásticas con: *Crematogaster montezumia*, *C. nigropilosa*, *C. curvispinosa*, *C. erecta*, *C. crinosa*, *Linepithema* sp., *Tapinoma* sp., *Nesomyrmex asper*, *Nylanderia* sp., *Pheidole* sp., *Wasmannia auropunctata* y *Solenopsis stricta* y *Monomorium floricola*, recolectadas en cafetales del Cauca y Chinchiná (Caldas). Posteriormente, las colonias se alimentaron con granos brocados. Se ofreció a las colonias 3 a 4 granos brocados con diferentes estados (larvas, adultos y huevos) de *H. hampei* obtenidos de granos pergamino de café infestados, proporcionados por el laboratorio Biocafé de Chinchiná (Caldas). Las colonias fueron revisadas diariamente para evaluar el consumo de broca. Las observaciones evidenciaron que las hormigas forrajeaban sobre los granos pero no penetran por los orificios, la mayoría de estas especies son más grandes que los orificios del grano de café, por los que algunas debían escavar los granos para poder entrar. Sólo *W. auropunctata* y *S. stricta* fueron observadas entrando en los granos sin mucho esfuerzo, debido a su diminuto tamaño (± 1 mm), y fueron más activas forrajeando sobre los granos. Finalmente, se seleccionó a *W. auropunctata*, dado que esta especie reportó tasas de depredación del 100% y colonias con numerosas obreras que garantizaban el número de muestras necesarias para los análisis. En total se alimentaron seis colonias de las cuales a tres se les ofreció entre tres a cuatro granos brocados partidos a la mitad con larvas, adultos y huevos de la broca expuestos, por cinco días además de agua y miel. A las colonias remanentes se les ofreció una presa alternativa criada en laboratorio (generalmente Acrididae, *Ephesthia kuehniella* o *Tenebrio molitor*), agua y miel. Antes de iniciar la alimentación con broca, las colonias fueron sometidas a un periodo de ayuno de cinco días (solo se les ofrecía agua y miel) con el objeto de estimular la depredación.

Extracción de ADN

El ADN total se extrajo de especímenes triturados utilizando el kit especializado QIAGEN DNeasy

Blood & Tissue Kit siguiendo el protocolo suplementario de purificación de ADN total de insectos del fabricante, con una excepción: en el paso 1 no se usó nitrógeno líquido ni mortero, sino que se añadieron 10 μ L de solución ATL (Tissue Lysis Buffer) amortiguadora a la muestra, se maceró con puntas de micropipeta estériles. Posteriormente, en el paso 2, se agregaron los 170 μ L restantes para completar 180 μ L de la ATL amortiguadora. El resto del proceso se realizó de la forma descrita en el protocolo.

PCR

Se llevó a cabo usando el par de cebadores CBB-COI-F (5'-TTGACAAAGGAGCAGGAACA-3') y CBB-COI-R (5'-TTCTGGCTGTATCCCAGGAG-3') específicos de *H. hampei* para amplificar un fragmento de 185 pb del gen COI, los cuales fueron probados en un trabajo anterior [9]. En dicho trabajo se realizó un análisis extenso de reactividad cruzada contra especies de insectos que se encuentran comúnmente en el interior de los frutos de café y otros 69 organismos no objetivo que representan 41 familias dentro de 11 órdenes de invertebrados. Estos cebadores no produjeron amplificación de ADN de ninguna de las otras especies examinadas.

Además, se utilizó el par de cebadores CI-13 (5'-ATA-ATTTTTTTATAGTTATACC-3') y CI-14 (5'-GTTTCT-TTTTTCCTCTTTC-3') diseñados en estudios moleculares con el género *Crematogaster* (Quek et al. 2004) para amplificar un fragmento de aproximadamente 608 pb del gen COI con el fin de confirmar el éxito de la extracción del ADN de las hormigas, así como su viabilidad para su uso en PCR.

Las reacciones de PCR (10 μ L de volumen final) se realizaron utilizando Go Taq Master Mix (Promega), con 0,2 μ M de cada cebador y 1 μ L de ADN molde cuantificado previamente por Nanodrop (0,4 - 40 ng). Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador Benchmark TC 9639. El ciclo térmico de la PCR para CBB-COI-F de 185 pb consistió en 95°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, con una extensión final de 72°C por 7 min. Para los otros dos cebadores (186 y 164 pb) el ciclo térmico de la PCR consistió en 95°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, con una extensión final de 72°C por 7 min. Finalmente, se realizaron geles de poliacrilamida y los productos

de PCR se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata (10 mg/mL).

Análisis genético en hormigas alimentadas con broca del café

Las muestras para los análisis de PCR fueron obtenidas a partir de individuos (adultos), en número variable y por separado (uno, tres y cinco, debido al pequeño tamaño de la hormiga), provenientes de tres colonias de *W. auropunctata* alimentadas con broca. A estos cebadores no se les cambió las condiciones. Las muestras se tomaron después de 24 h de comprobarse la ingesta de broca por parte de la hormiga. Como controles se emplearon ejemplares de esta especie, de tres colonias diferentes alimentadas sobre larvas de *Ephesthia kuehniella*, *Tenebrio molitor* y especímenes de Acrididae, control de extracción (sin ADN) y control de PCR. Se realizaron tres réplicas de cada nivel de tratamiento. Se efectuó la PCR con un par de cebadores específicos para *H. hampei*, teniendo como control positivo muestras con ADN extraído de individuos de broca. En cada reacción de PCR se hicieron dos repeticiones usando el ADN de individuos o grupos de individuos que fueron alimentados con broca, así como de los controles (alimentados con otras presas).

RESULTADOS

Los cebadores específicos de *H. hampei* produjeron amplificación del fragmento de 185 pb en muestras de ADN extraído de adultos y larvas de broca como también en muestras de ADN extraído de obreras de *W. auropunctata* que habían consumido broca. Sin embargo, se detectó amplificación de una pequeña banda muy próxima a la banda de broca en hormigas que no habían consumido broca (controles). Esta banda no específica de broca, se especula que puede tratarse de un falso positivo atribuible posiblemente a la presencia de material genético bacteriano en el contenido intestinal de la hormiga. Para eliminar la banda de las muestras de hormigas sin consumo de broca, obtenidas con el par de cebadores CBB-COI-F y CBB-COI-R se modificaron las condiciones de temperatura de la PCR desde 55, 57 y 59°C, y también se ensayaron diferentes cantidades de ADN (2 y 4 µL), con el objeto de disminuir la posibilidad de alineamiento de los cebadores a zonas no específicas. Sin embargo, la banda apareció en el 83,72% de las

muestras de hormigas sin consumo. Los resultados obtenidos para el otro par de cebadores (186 y 164 pb), fueron similares (cuadro 1).

Los resultados del presente estudio no permiten confirmar la potencialidad de los cebadores ensayados para evaluar la conectividad trófica entre la hormiga *W. auropunctata* y la broca en los ecosistemas cafeteros. Una posible explicación recae en las reacciones cruzadas que aparecen como falsos positivos en el sistema de detección por PCR debido a reacciones de baja eficiencia.

Esto puede estar relacionado con la forma en que las hormigas ingieren su alimento, el cual no se consume por completo. Ellas poseen un saco, llamado buche o estómago social, donde pre-digieren su alimento y parte de su contenido es regurgitado para alimentar a otras obreras y larvas [10]. Por lo tanto, es posible que una cantidad mínima de ADN de broca sea conservada en su estómago. Un estudio [11] ha demostrado que si el ADN dentro de la muestra contiene un pequeño número de secuencias en concentraciones relativamente altas, entonces las secuencias menos concentradas a menudo no amplifican porque la PCR favorece los tipos de ADN dominantes; o por "necesidad" del cebador es posible que se amplifique tanto el ADN de la presa como el del depredador [11]. Este es un problema particular en estudios de dieta molecular, donde el ADN del depredador está a menudo presente en mayor exceso que el ADN derivado del alimento [11].

Cuadro 1. Número total y porcentaje de detección de los cebadores diseñados para broca, en BB: broca; HCC: hormigas con consumo de broca y HSC: hormigas sin consumo de broca.

Cebadores	BB (+)	BB (-)	HCC (+)	HCC (-)	HSC (+)	HSC (-)
CBB-COI-F y CBB-COI-R (185 pb)	5	0	17	1	18	4
Hh-186-F y Hh-186-R (186 pb)	4	0	5	0	8	1
Hh-164-F y Hh-164-R (164 pb)	5	0	5	0	10	2
Total	14	0	27	1	36	7
% de detección	100		96,59		83,72	

Pocos estudios han utilizado el contenido estomacal de las hormigas para análisis moleculares debido a que las hormigas han revelado dificultades para obtener ADN de presa usando extracciones de cuerpo entero. Un estudio [12] probó 24 hormigueros para evaluar la depredación de *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) utilizando PCR pero ninguno resultó positivo, a pesar de la discrepancia del 12% de los ensayos positivos usando inmuno absorción enzimática para la misma presa. Del mismo modo, un estudio [13] que investigó la depredación de *Camponotus pennsylvanicus* (Hymenoptera: Formicidae) sobre barrenadores de roble rojo (Coleoptera: Cerambycidae) reveló que muy pocos especímenes capturados en campo fueron positivos (1,7%) a pesar de altos niveles de observaciones de depredación en las masas de huevos colocadas artificialmente. Aunque estos estudios no analizaron si se inhibía la extracción y la amplificación del ADN del intestino de la hormiga, este fenómeno se ha reportado en *Tetramorium caespitum*, *Solenopsis invicta* y *Camponotus floridanus* [6]. Estos autores encontraron que tanto el gáster como el buche producían niveles significativos de inhibición de la PCR [6].

Dentro de las hormigas, se ha postulado que la inhibición de la PCR podría ser debido a la interferencia de las glándulas dentro del gáster, donde se encuentra la mayoría del tracto digestivo de la hormiga adulta [14]. La incertidumbre en la detección de ADN en el gáster de las hormigas y la falta de fiabilidad de los datos así obtenidos indican la importancia de caracterizar el efecto de los órganos de las hormigas sobre la detección del ADN y el éxito de la amplificación.

Aunque no era el objetivo de este estudio evaluar la eficiencia de depredación sobre la broca, y por tanto no se presentan estos resultados, sí se puede destacar que dos de las especies que se criaron en laboratorio *W. auropunctata* y *Solenopsis stricta* depredaron broca en dichas condiciones. Estas hormigas, de hábitos arborícolas y rastrosos, exhiben dos características eco-fisiológicas que permitirían, eventualmente, ser involucradas en un manejo integrado de la broca en Colombia. Primero, por ser muy pequeñas (de ± 1 mm), su tamaño facilita la depredación de la broca dentro del grano y, segundo, sus hábitos de anidar en ramitas y en tallos de plátano cosechado lo que permitiría la fácil provisión de sitios de anidación en los cafetales y así aumentar su impacto sobre el control de la broca. En particular,

W. auropunctata fue encontrada depredando dentro de los granos en condiciones de laboratorio y campo, lo que indica que es una especie que sube a los arbustos del café para forrajear, y puede disminuir el daño que la broca hace al producto principal. Al mismo tiempo, al anidar en ramitas sobre el suelo puede eliminar sectores de la plaga que se encuentren en los granos que caen al suelo, disminuyendo los focos de reinfección. No obstante, ambas especies, poseen un prontuario bastante negativo por su carácter invasor y agresivo [15], por lo cual interfieren, con sus picaduras, el proceso de recolección del café. Con respecto al carácter invasor de *W. auropunctata*, se aclara que esta especie se usó como modelo para estandarizar la metodología de detección de broca en el trabajo, pero esta metodología se podría implementar para otras especies de hormigas nativas con potencial depredador hacia la broca del café.

Los resultados de este estudio plantean la necesidad de seguir explorando herramientas moleculares para comprender el papel agroecológico de las hormigas depredadoras en el agroecosistema del café, pues diferentes mecanismos ecológicos y fisiológicos podrían impedir concluir con certeza las conexiones en la red trófica a partir de marcadores moleculares para la broca del café.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a dos evaluadores anónimos por sus valiosos comentarios. El laboratorio de Entomología de Cenicafé aportó los granos brocados en pergamino. Selene Escobar suministró colonias de hormigas colectadas en el campo; Janine Herrera, Omar Marín y Andrés López, mantuvieron las colonias artificiales; Fernando Díaz y Yesica López asistieron en laboratorio y con los análisis. El estudio fue financiado por el proyecto "Funciones ecológicas y hormigas en cafetales con distinta intensidad de manejo" financiado por COLCIENCIAS, Programa Nacional de Ciencias Básicas código 110656933821, contrato RC. No. 0648-2013 y por la Universidad del Valle.

CONCLUSIÓN

No se confirma la potencialidad de los cebadores ensayados para evaluar que *W. auropunctata* ha depredado la broca del café.

REFERENCIAS

- [1] MORRIS, J.R. and PERFECTO, I. Testing the potential for ant predation of immature coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) life stages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 233, 2016, p. 224-228.
- [2] MORRIS, J.R., VANDERMEER, J. and PERFECTO, I. A key stone ant species provides robust biological control of the coffee berry borer under varying pest densities. *Plos One*, 10(11), 2015, p.1-15.
- [3] DIAME, L., GRECHI, I., REY, J.Y., SANE, C.A.B., DIATTA, P., VAYSSIERES, J.F., YASMINE, A., DE BON, H. and DIARRA, K. Influence of *Oecophylla longinoda* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Formicidae) on mango infestation by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in relation to Senegalese orchard design and management practices. *African Entomologist*, 23, 2015, p. 294-305.
- [4] KING, R.A., READ, D.S., TRAUGOTT, M. and SYMONDSON, O. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular ecology*, 17(4), 2008, p. 947-963.
- [5] SIM, S.B., YONEISHI, N.M., BRILL, E., GEIB, S.M. and FOLLETT, P.A. Molecular markers detect cryptic predation on coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae) by silvanid and laemophloeid flat bark beetles (Coleoptera: Silvanidae, Laemophloeidae) in coffee beans. *Journal of Economic Entomology*, 109(1), 2016, p. 100-105.
- [6] PENN, H.J., CHAPMAN, E.G. and HARWOOD, J.D. Overcoming PCR inhibition during DNA-based gut content analysis of ants. *Environmental Entomology*, 45(5), 2016, p. 1255-1261.
- [7] ARMBRECHT, I. *Agroecología y Biodiversidad*. Cali (Colombia): Programa Editorial, Universidad del Valle, 2016.
- [8] PENG, R. K. and CHRISTIAN, K. The control efficacy of the weaver ant, *Oecophylla smaragdina* (Hymenoptera: Formicidae), on the mango leafhopper, *Idioscopus nitidulus* (Hemiptera: Cicadellidea) in mango orchards in the Northern Territory. *International Journal of Pest Management*, 51, 2005, p. 297-304.
- [9] JARAMILLO, J., CHAPMAN, E.G., VEGA, F.E. and HARWOOD, J.D. Molecular diagnosis of a previously unreported predator-prey association in coffee: *Karnyothrips flavipes* Jones (Thysanoptera: Phlaeothripidae) predation on the coffee berry borer. *Naturwissenschaften*, 97, 2010, p. 291 -298.
- [10] OLIVEIRA, P.S. and S. KOPTUR (Eds). *Ant-plant interactions. Impacts of humans on terrestrial ecosystems*. Cambridge (United Kingdom): Cambridge University Press, 2017.
- [11] VESTHEIM, H. and JARMAN, S.N. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5(12), 2008, p. 1-11.
- [12] FOURNIER, V., HAGLER, J., DAANE, K., DE LEON, J. and GROVES, R. Identifying the predator complex of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae): a comparative study of the efficacy of an ELISA and PCR gut content assay. *Oecologia*, 157, 2008, p. 629-640.
- [13] MUILENBURG, V.L., GOGGIN, F.L., HEBERT, S.L., JIA, L. and STEPHEN, S.M. Ant predation on red oak borer confirmed by field observation and molecular gut-content analysis. *Agricultural and Forest Entomology*, 10, 2008, p. 205-213.
- [14] GADAU, J. DNA isolation from ants. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009, doi:10.1101/pdb.prot5245
- [15] PASSERA, L. *Characteristics of tramp species*. Boulder (USA): Williams (Editor), Exotic Ants. Westview Press, 1994, p. 23-43.