

Universidad
del Cauca



FOTOS DE PORTADA
Flickr - Unsplash - Archivo propio



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

Biotecnología 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. 19 No 1 - Enero - Junio 2021

Héctor Samuel Villada Castillo- PhD.
Editor

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, Ph.D. 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	Aidé Sáenz Galindo, PhD. Universidad Autónoma de Coahuila. Mexico
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
Raúl Rodríguez Herrera, Ph. D. Plant Breeding 1999. Texas A&M University-USA.	
Vijaya Raghavan - Ph. D. Universidad de Mcgill de Canadá	

Asistente Editorial
Willian Enrique Sotelo O.

Diseño y Diagramación
Olga Nohelia Benavides Imbachí
Área de Desarrollo Editorial
Universidad del Cauca



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
Jesús Eduardo Bravo Gómez

Jefe Departamento Ciencias Agropecuarias
Roman Ospina

Coordinador Programa Ingeniería Forestal
Juan Carlos Villalba

Coordinador Programa De Ingeniería Agroindustrial
Carlos Andrés Chantre

Coordinador Programa De Ingeniería Agropecuaria
Diego Vergara Collazos

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 citaciones 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, Classes 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.ilsa.org/Europe/Publications/C2002Con_Food.pdf. [citado 13 mayo de 2009].

EDITORIAL

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

- 16 **Antagonismo *in vitro* por consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra el fitopatógeno *Sclerotinia* sp**
ZUBIETA-CORONADO, DIEGO-ARTURO;
ECHEVERRY-PRIETO, LENA-CAROLINA;
ZAFRA-MEJÍA, CARLOS-ALFONZO
- 32 **Efecto de la humedad relativa en la capacidad encapsulante de los coproductos de la molienda húmeda del grano de amaranto**
ROA-ACOSTA, DIEGO-FERNANDO; NIETO-CALVACHE, JHON-EDINSON;
AGUDELO- LAVERDE, LINA-MARCELA
- 45 **Germinación de un tipo venezolano de *Capsicum chinense* jacq.: influencia de la maduración del fruto y de la extracción de la semilla desde el fruto**
GARRIDO, LUZ; LAURENTIN, HERNÁN
- 54 **Adsorción de cromo (VI) y mercurio (II) en solución utilizando jacinto (*Eichhornia crassipes*)**
TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; PAZ, ISABEL; ACEVEDO-CORREA, DIOFANOR;
ESPINOSA-FORTICH, MARÍA; LÓPEZ-BADEL, CRISTINA
- 66 **Prevalencia de cinco virus de ARN en tubérculos-semilla de papa cultivados en Antioquia (Colombia)**
GALLO-GARCÍA, YULIANA; SIERRA-MEJIA, ANDREA ;
GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO
- 79 **Panorama cuantitativo de la biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial**
VALVERDE-VALVERDE, MARIA-ANGELICA;
DELGADO-HURTADO, CAROLINA;
RENGIFO-RODAS, CARLOS-FELIPE
- 92 **Evaluación de métodos para la inoculación y diagnóstico del virus del mosaico del pepino (CMV)**
SÁNCHEZ, MANUEL-ALEJANDRO; VILLEGAS-ESTRADA, BERNARDO;
VALENCIA-JIMÉNEZ, ARNUBIO

- 105 Efecto de *Bacillus subtilis* sobre metabolitos sanguíneos y parámetros productivos en pollo de engorde**
MAYA-ORTEGA, CARLOS-ABEL ; MADRID-GARCÉS, TOMÁS-ANTONIO;
PARRA-SUESCÚN, JAIME-EDUARDO
- 117 Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón obtenido de dos variedades de batata (*Ipomoea batatas*)**
MURILLO-MARTÍNEZ, MARÍA; ALVIS-BERMÚDEZ, ARMANDO;
ARRAZOLA-PATERNINA, GUILLERMO
- 128 Rizobios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil**
CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO; DA SILVA-ARAUJO, FERNANDA;
SACCOL-DE SÁ, ENILSON-LUIZ
- 139 Desarrollo de una matriz expandida elaborada a partir de almidón y harina de yuca por extrusión**
LUCIO-IDROBO, YERALDIN; ARBOLEDA-MUÑOZ,
GERMAN-ANTONIO; DELGADO-MUÑOZ, KAREN-LORENA;
VILLADA-CASTILLO, HÉCTOR-SAMUEL
- 153 Evaluación de parámetros zootécnicos en terneros suplementados con un alimento fermentado en estado sólido***
RODRÍGUEZ-SALGADO, ANGELA-MIREYA;
RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO;
BORRAS-SANDOVAL, LUIS-MIGUEL
- 167 ¿Cómo los consumidores valoran atributos de calidad de carne bovina y su disposición a pago?**
BARRAGÁN-HERNÁNDEZ, WILSON; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA;
OLIVERA-ANGEL, MARTHA; ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN
- 180 Extracto de taninos del fruto piñón de oreja (*Enterolobium cyclocarpum*) como curtiente para piel de conejo común (*Oryctolagus cuniculus*)***
PAZ-DÍAZ, HÉCTOR-JULIO; AGUDELO-BELTRAN, ASTRID-YERITZA;
PLATA-PASTOR, DAYANNA- ANGÉLICA;
PACHECO-VALDERRAMA, MÓNICA-MARÍA;
SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA;
MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR
- 191 Efecto crioprotector de la yema de huevo en semen de *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae)***
DUARTE-TRUJILLO, ASTRID-STEFANÍA;
ARDILA-ARTUNDUAGA, MICHELLE-BRIGITTE;
GUAJE-RAMÍREZ, DIANA NATHALIE;
MEDINA-ROBLES, VÍCTOR-AURICIO

- 206 Ácidos ganodéricos en *Ganoderma sp*, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado**
RAMÍREZ-AYALA, WILDER; GUEVARA-BRAVO, CARLOS-ALBERTO;
RODRÍGUEZ-ESPINOSA, JHON-ALEXANDER
- 217 Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos**
JURADO-GÁMEZ, HENRY; ZAMBRANO-MORA, EDWARD;
FAJARDO-ARGOTI, CATALINA
- 230 Efecto del abono orgánico líquido mineralizado en la producción de biomasa de morera (*Morus alba*)**
CAMAYO-VARGAS, MARLON; MONTES-ROJAS, CONSUELO;
ANAYA-FLOREZ, MARÍA- DEL SOCORRO
- 244 Evaluación agronómica de genotipos de *Theobroma cacao* L. en la Amazonia colombiana**
GAMBOA-TABARES, JEAN-ALEXÁNDER; RODRÍGUEZ-ORTIZ, JAIME-ANDRÉS;
GAMBOA-TABARES, ARMANDO; DURÁN-BAUTISTA, ERVIN-HUMPREY;
ROJAS-VARGAS, SORAIDA
- 256 Los sistemas agroforestales y la incidencia sobre el estatus hídrico en árboles de cacao***
ORDOÑEZ-ESPINOSA, CLAUDIA-MERCEDES; SUÁREZ-SALAZAR, JUAN-CARLOS;
RANGEL-CHURIO, JESUS-ORLANDO, SAAVEDRA-MORA, DAVID

Debo manifestar que cuando se solicitó una editorial para la Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, de inmediato pensé en escribir sobre el agua como bien común, cómo ese elemento que nos ha permitido a todos los seres vivos poder existir en este planeta, donde el 93% de su superficie la contiene.

De esa "cantidad", tan sólo una pequeña parte hace posible la vida a una gran diversidad de organismos incluido el hombre, y que sólo podemos usarla para nuestros procesos vitales cuando de agua dulce se trata, y ésta sólo representa el 3% de la que, se dice, hay disponible en diversos ecosistemas, hoy disminuidos y alterados en sus estructuras y funciones por la acción del cambio climático, pero que, en términos reales de acceso, sólo disponemos del 1% para las diversas actividades requeridas para mantener la vida. El volumen existente podría verse como suficiente, pero en la práctica y realidad, sufrimos de escasez en medio de la abundancia, paradoja de la vida en el planeta agua, perdón en el llamado tierra.

A pesar de los acuerdos internacionales dispuestos por países, en lo referente a las diversas posturas para conservar la vida, las Naciones Unidas, como garante de los objetivos del desarrollo del Milenio, definió los compromisos de los países que de ésta organización hacen parte, pero los resultados de éstas apuestas son cada día más preocupantes, no sólo para la especie humana, sino para los diversos ecosistemas que soportan la capacidad de carga que los modelos de desarrollo vienen estableciendo en los continentes y en las apuestas de las políticas que los sustentan.

Cuando se revisa el uso del agua a nivel mundial, con base en las estadísticas de la FAO, el 69% se usa para la agricultura, 19 % para la industria y 12% para uso doméstico, si miramos éstos usos a nivel de las américas, los porcentajes corresponden en su orden al 51, 34 y 15% respectivamente. Para Colombia, las cifras en los términos de usos tienen la misma tendencia, y en este sentido podríamos preguntarnos si el agua para fines agrarios (Agropecuario, Agroindustrial y Forestal) es un tema central para cualquier debate sobre los recursos hídricos, la seguridad alimentaria y el desarrollo sustentable.

Es de esperarse que a futuro se incremente la competencia por los recursos hídricos y la presión tendrá como mira la agricultura y la reasignación del agua en éste sector. El crecimiento económico generará la necesidad de realizar cambios en la llamada "asignación sectorial del agua", todo por el inminente crecimiento de la población, la urbanización y la industrialización, llevando a tomar medidas en el uso eficiente del agua con base en los estudios del llamado estrés hídrico y los efectos del cambio climático.

El Volumen 19 número 1 de nuestra revista contiene artículos en diversos temas del sector Agrario, y bien vale la pena preguntarnos si en cada uno de sus desarrollos investigativos el agua cumple, ha cumplido o cumpliría un papel fundamental en términos de la concepción cómo “elemento, recurso o de bien común”, esencial para la producción, la productividad o la transformación en los diversos resultados de las investigaciones, concibiéndola como el eje articulador de los territorios, de las territorialidades y de la vida.

La gestión de los recursos hídricos, la participación social, en especial en las zonas rurales, a través de los sistemas multipropósito de abastecimiento y las políticas de gobernabilidad establecidas desde el ejecutivo, establecen escenarios donde nuestras Universidades a través de la academia, la investigación y la interacción social jugamos un papel fundamental en los cambios de paradigmas hacia las concepciones del agua, su uso, manejo y sostenibilidad, en procura de dar el alcance que nos permita comprender que no es posible hablar de la seguridad alimentaria sin la seguridad hídrica.

M.Sc. JUAN PABLO PAZ CONCHA
Profesor investigador

Antagonismo *in vitro* por consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra el fitopatógeno *Sclerotinia* sp^{*}

In vitro antagonism by consortium of *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp. against the phytopathogen *Sclerotinia* sp

Antagonismo *in vitro* por *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. contra o fitopatógeno *Sclerotinia* sp

ZUBIETA-CORONADO, DIEGO-ARTURO¹; ECHEVERRY-PRIETO, LENA-CAROLINA²;
ZAFRA-MEJÍA, CARLOS-ALFONZO³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 19 de Agosto 2019.

Aprobado para publicación: 13 de Octubre 2020.

- * Título del proyecto de origen: "Evaluación *in vitro* e *in vivo* del control biológico hecho por *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. sobre el fitopatógeno *Sclerotinia* sp. en lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Batavia". Financiación: Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CIDC) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia. Culminación: 27 de mayo 05 de 2019.
- 1 Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Grupo de investigación GIIA-UD. Especialización en Higiene y Salud Ocupacional. Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3568-8282>
 - 2 Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Grupo de investigación GIIA-UD. Maestría en Ciencias Biológicas. Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6940-4383>
 - 3 Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Grupo de investigación GIIA-UD. Doctorado en Ingeniería Ambiental. Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-4061-4897>

Correspondencia: lcecheverryp@udistrital.edu.co

RESUMEN

Los hongos como controladores biológicos son importantes en el desarrollo de bioproductos para una agricultura sostenible en el manejo de fitopatógenos como *Sclerotinia sp.*, causante de la podredumbre blanca en cultivos de lechuga, puesto que la viabilidad infecciosa en el suelo dura hasta cinco años. El cultivo de lechuga es esencial en la economía agrícola de Colombia, y *Sclerotinia sp.* causa pérdidas hasta del 50% de los cultivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la capacidad antagonista de tres cepas de *Trichoderma sp.* Tr1, Tr2 y Tr3 y tres de *Aspergillus sp.* As1, As2 y As3 contra *Sclerotinia sp. Scl.*, individualmente y en consorcios. La recuperación, mantenimiento y evaluación de los hongos se realizó mediante los medios PDA, Jugo V8 y Miel-Avena. Las cepas controladoras -Tr1, Tr2, Tr3, As1, As2 y As3- se enfrentaron entre ellas y en consorcios contra el fitopatógeno con técnica dual. Los consorcios As1+As2+Tr2, As1+As2+Tr1, y As1+As2+Tr3 tuvieron un grado de inhibición sobre el fitopatógeno, siendo más eficiente la combinación As1+As2+Tr1 -85,1%-; e individualmente las cepas Tr2 y As1 con una eficiencia del 95,6% y 95,1%, respectivamente. Se corroboró que el crecimiento de *Scl.* empleando los consorcios no fue mayor al 14,9% en el mejor tratamiento. En ninguno de los enfrentamientos con los consorcios se evidenció la formación de esclerocios, la estructura de resistencia en el proceso de infección y persistencia en suelos a los diez días de evaluación.

ABSTRACT

Fungi as biological controllers are important in development of bioproducts for sustainable agriculture in the management of phytopathogens such as *Sclerotinia sp.*, which causes white rot in lettuce, crops inasmuch as infectious viability in soil lasts up until five years. Lettuce cultivation is essential in Colombia's agricultural economy, and *Sclerotinia sp.* causes losses until 50% of crops. The aim of this work was to evaluate *in vitro* the antagonistic capacity of three strains of *Trichoderma sp.* Tr1, Tr2 and Tr3 and, three strains of *Aspergillus sp.* As1, As2 and As3 against *Sclerotinia sp. Scl.*, individually and in consortia. Recovering, maintenance and evaluation of fungi was carried out by mediums as PDA, V8 Juice and Honey-Oat. The control strains -Tr1, Tr2, Tr3, As1, As2 and As3- were confronted among them and in consortia against the phytopathogen with dual technique. The consortia As1+As2+Tr2, As1+As2+Tr1, and As1+As2+Tr3 had a degree of inhibition on the phytopathogen, being more efficient the combination As1+As2+Tr1 -85,1%-; and individually the strains Tr2 and As1 with an efficiency of 95,6% and 95,1%, respectively. It was corroborated that the growth of *Scl.* using the consortia was not more than 14,9% in the best treatment. In none of the confrontations with the consortia was evidence of sclerotia formation, resistance structure for infection process and persistence in soils after to ten days of evaluation.

PALABRAS CLAVE:

Antagonistas fúngicos;
Consortio; Control biológico;
Podredumbre blanca;
Fitopatógeno; *Trichoderma sp.*;
Aspergillus sp.; *Sclerotinia sp.*

KEYWORDS:

Fungal antagonists; Consortium;
Biological control; White rot,
Phytopathogen; *Trichoderma sp.*;
Aspergillus sp.; *Sclerotinia sp.*

PALAVRAS-CHAVE:

Antagonistas de fungos;
Consórcio; Controle biológico;
Podridão branca; Fitopatógenos;
Trichoderma sp.; *Aspergillus sp.*;
Sclerotinia sp.

Cómo citar este artículo: ZUBIETA-CORONADO, DIEGO-ARTURO; ECHEVERRY-PRIETO, LENA-CAROLINA; ZAFRA-MEJÍA, CARLOS-ALFONZO. Antagonismo *in vitro* por consorcios de *Trichoderma sp.* y *Aspergillus sp.* contra el fitopatógeno *Sclerotinia sp.* Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 16-31. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)16-31](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)16-31)

RESUMO

Os fungos, como controladores biológicos, são importantes no desenvolvimento de bioprodutos para a agricultura sustentável no manejo de fitopatógenos como *Sclerotinia* sp., que causa podridão branca nas culturas de alface, visto que a viabilidade infecciosa no solo dura até cinco anos. O cultivo da alface é essencial na economia agrícola da Colômbia e *Sclerotinia* sp. causa perdas até 50% das lavouras. O objetivo deste trabalho foi avaliar in vitro a capacidade antagonista de três linhagens de *Trichoderma* sp. Tr1, Tr2 e Tr3 e, três linhagens de *Aspergillus* sp. As1, As2 e As3 contra *Sclerotinia* sp. Scl., individualmente e em consórcios. A recuperação, manutenção e avaliação de fungos foram realizadas por meios como PDA, Suco V8 e Aveia-Mel. As cepas de controle - Tr1, Tr2, Tr3, As1, As2 e As3 - foram confrontadas entre si e em consórcios contra o fitopatógeno com técnica dupla. Os consórcios As1 + As2 + Tr2, As1 + As2 + Tr1 e As1 + As2 + Tr3 apresentaram um grau de inibição no fitopatógeno, sendo mais eficiente a combinação As1 + As2 + Tr1 -85,1% -; e individualmente as linhagens Tr2 e As1 com uma eficiência de 95,6% e 95,1%, respectivamente. Foi corroborado que o crescimento de Scl. o uso dos consórcios não foi superior a 14,9% no melhor tratamento. Em nenhum dos confrontos com os consórcios houve evidência de formação de escleródios, estrutura de resistência ao processo de infecção e persistência no solo até dez dias de avaliação.

INTRODUCCIÓN

La lechuga (*Lactuca sativa*) es originaria del Mediterráneo oriental y del occidente de Asia [1, 2], y su cultivo puede realizarse a nivel del mar hasta 2600 msnm [3]. Es un vegetal rico en sustancias orgánicas, vitaminas, minerales y metabolitos secundarios como los terpenoides, flavonoides y fenoles, que aportan a su particular sabor y alto valor nutritivo [2, 4]. En Colombia, este cultivo se desarrolla principalmente en Cundinamarca, Antioquia, Nariño y Norte de Santander. En Cundinamarca es uno de los cultivos pilares de la economía rural, y durante el año 2018 se produjeron 23.525 ton. Durante el mismo año, a nivel nacional la producción de lechuga fue de 49982,58 ton y el rendimiento del cultivo en 2018 fue de 238 ton/ha y en 2017 de 233,63 [5, 6].

De acuerdo con Pérez *et al.* [7], las pérdidas en los cultivos de lechuga en la sabana de Bogotá por infección por *Sclerotinia* sp están entre el 30-50% de la producción total. Este hongo puede infectar a más de 400 especies de plantas, incluidos cultivos y hortalizas económicamente importantes [8]. El fitopatógeno *Sclerotinia* sp. se puede propagar por ascosporas, lo que favorece su diseminación a plantas adyacentes y forma esclerocios como estructuras de resistencia. El inóculo puede infectar tallos, hojas, flores y raíces. Las plantas pueden ser infectadas desde su etapa de semilla hasta su madurez, y su incidencia está relacionada con la cantidad de esclerocios que se encuentran en el suelo. Adicionalmente, *Sclerotinia* sp. puede persistir en el suelo durante varios años o en lotes de semillas y, cuando existen las condiciones ambientales adecuadas, germina dando lugar a hifas infecciosas o produce un apotecio que libera ascosporas producidas sexualmente [7-9]. La viabilidad de los esclerocios puede alcanzar veinte años en latencia y su dispersión es rápida con los procesos de arado. La supervivencia de los esclerocios en el suelo dificulta el manejo de *Sclerotinia* sp., por la supervivencia aún en condiciones adversas para el fitopatógeno [10, 11].

El manejo tradicional de las plagas se hace con agentes químicos y se estima que en Colombia se emplean unos 600 plaguicidas, siendo una fuente de contaminación en suelos y aguas, los cuales son responsables de afecciones a los seres vivos de dichos ecosistemas y sobre la salud humana [12, 13]. El uso excesivo de agroquímicos puede incrementar la resistencia a estos compuestos de los hongos fitopatógenos, haciendo cada vez más difícil su manejo. Por consiguiente, el control biológico es una herramienta alternativa amigable con el ambiente para el manejo de plagas y enfermedades, que se basa en el empleo de organismos biológicos y sus productos metabólicos con el fin de reducirla, eliminarla o controlarla [14, 15]. Según la literatura, se han realizado varios trabajos para evaluar organismos antagonistas para el control de *Sclerotinia* sp., como por ejemplo: *Trichoderma* sp., *Aspergillus flavipes*, *Muscador yucatanensis*, *Penicillium commune*, *Bacillus* sp., *Clonostachys* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudomonas* sp. y *Coniothyrium* sp. [9, 15-21].

Recientemente, el uso de hongos endófitos como antagonistas es una opción llamativa para el manejo integrado de plagas por su mínimo impacto sobre el ambiente [15]; por tal motivo, en este trabajo de investigación se aislaron e identificaron de suelos rizosféricos tres cepas de *Trichoderma* sp. y tres cepas de *Aspergillus* sp. autóctonos, para evaluar la relación antagonista de éstos hongos individualmente y mediante consorcios frente al fitopatógeno *Sclerotinia* sp. Este fitopatógeno fue aislado directamente de lechugas que presentaban los síntomas de la podredumbre blanca. Por último, se estudiaron agrupaciones de hongos antagonistas para poder inhibir el desarrollo de este fitopatógeno en cultivos de lechuga.

MÉTODO

Sitio de muestreo

El sitio seleccionado para la recolección de muestras de suelo fue en la ciudad de Bogotá, Colombia. Las muestras se recolectaron de tres zonas con las siguientes coordenadas: Zona 1: 4°35'49,55" N – 74°03'51,86" W, Zona 2: 4°35'51,03" N – 74°03'51,57" W y Zona 3: 4°35'50,80" N – 74°03'51,64" W y se rotularon como MT01, MT02 y MT03, respectivamente. La ubicación hace parte de los cerros orientales de Bogotá, con una humedad del 81%, una altura aproximada de 2675 msnm y una temperatura que oscila durante el día entre los 6 y 18°C.

Recuperación y aislamiento de hongos con potencial biocontrolador

El muestreo de suelos rizosféricos se realizó aleatoriamente en una sección de 20x20 cm hasta obtener 10 g por cada zona (n=3), de acuerdo con la metodología reportada por Cline [22]. Las muestras de suelos recolectadas se sembraron en los medios de cultivo PDA, Jugo V8 y Miel-Avena usando el método de cuadrícula. Se incubaron por un lapso de 10 días a una temperatura de 25°C para que los hongos desarrollaran sus estructuras (i.e., micelio, conidias, hifas, conidióforos, y vesículas), lo cual permitió la identificación macroscópica y microscópica de cada aislamiento [23-27]. Se recuperaron seis hongos en total y posterior a la identificación se etiquetaron los aislamientos como: Tr1, Tr2 y Tr3 para *Trichoderma* sp. y As1, As2 y As3 para *Aspergillus* sp.

Recolección de material vegetal, recuperación y mantenimiento del hongo fitopatógeno

Se recolectaron lechugas que provenían del municipio de Mosquera (Cundinamarca, Colombia) y que presentaban las características de infección producidas por el hongo *Sclerotinia* sp., como marchitamiento de hojas externas, lesiones de color marrón en el tejido foliar, pudrición blanda acuosa, crecimiento de micelio de color blanco y/o presencia de esclerocios [28]. Estas muestras fueron recolectadas del centro de acopio Corporación de Abastos de Bogotá S.A. (CORABASTOS). Las muestras se conservaron a 4°C y se transportaron al laboratorio de Microbiología y bioprospección medioambiental (MiBioMA) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (Bogotá, Colombia). El aislamiento de *Sclerotinia* sp. se realizó mediante la técnica expuesta por Sánchez [29]. Los cortes de 5-10 mm de las hojas de lechuga infectadas se colocaron en una solución de cloro al 10% por 20 segundos, se lavaron tres veces con agua destilada, se colocaron en papel secante, y se ubicaron en el centro de los medios de cultivo PDA, Jugo V8 y Miel-Avena. Éstas se incubaron por diez días a una temperatura de 25°C.

Adicionalmente, se realizó un aislamiento a partir de esclerocios, desinfectándolos con una mezcla de hipoclorito al 70%, fenol al 5% y alcohol etílico por un tiempo de 5 minutos; los esclerocios se lavaron con agua destilada estéril y con una cuchilla estéril se cortaron para sembrarlos en los medios de cultivo de evaluación. La temperatura y tiempo de incubación fue de 25°C por 10 días [29]. Se identificaron macroscópica y microscópica del hongo fitopatógeno se realizó de acuerdo con Saharan, G.S. & Mehta, N [30].

Pruebas de antagonismo

Antes de realizar las pruebas de antagonismo se estimó el crecimiento radial de cada hongo aislado en los tres medios de cultivo de evaluación, midiendo el diámetro de las colonias los días 3, 7 y 10. La esporulación de *Trichoderma* sp y *Aspergillus* se realizó según Pedroza *et al.* [31] al culminar los 10 días de incubación. Para *Sclerotinia* se contaron los esclerocios a los 10 días de crecimiento.

Se realizaron pruebas de antagonismo contra el fitopatógeno a través de la técnica dual [32], con las tres cepas de *Trichoderma* sp. (Tr1, Tr2 y Tr3) y las tres cepas de *Aspergillus* sp. (As1, As2 y As3). También, se evaluó el antagonismo entre ellos, así: As1 vs. Tr1, As1 vs. Tr2, As1 vs Tr3, As2 vs. Tr1, As2 vs. Tr2, As2 vs Tr3, As3 vs. Tr1, As3 vs. Tr2, As3 vs Tr3. En cada caja de Petri se marcó una línea para dividir en dos partes iguales el área de siembra, y en la mitad de cada lado se dispusieron discos de medio de cultivo con micelio de los hongos a enfrentar de 5 mm de diámetro [33]. Los quince antagonismos se incubaron por diez días a 25°C. Cada enfrentamiento se realizó en los medios PDA, Jugo V8 y Miel-Avena. La evaluación se realizó de acuerdo con Bell *et al.* (1982), referenciado por Corrêa *et al.* [34]; y se modificó cuando se enfrentaron los posibles biocontroladores teniendo la escala de notas No. 1 (Cuadro 1 y Figura 1), con base en el método de similaridad de Jaccard [35].

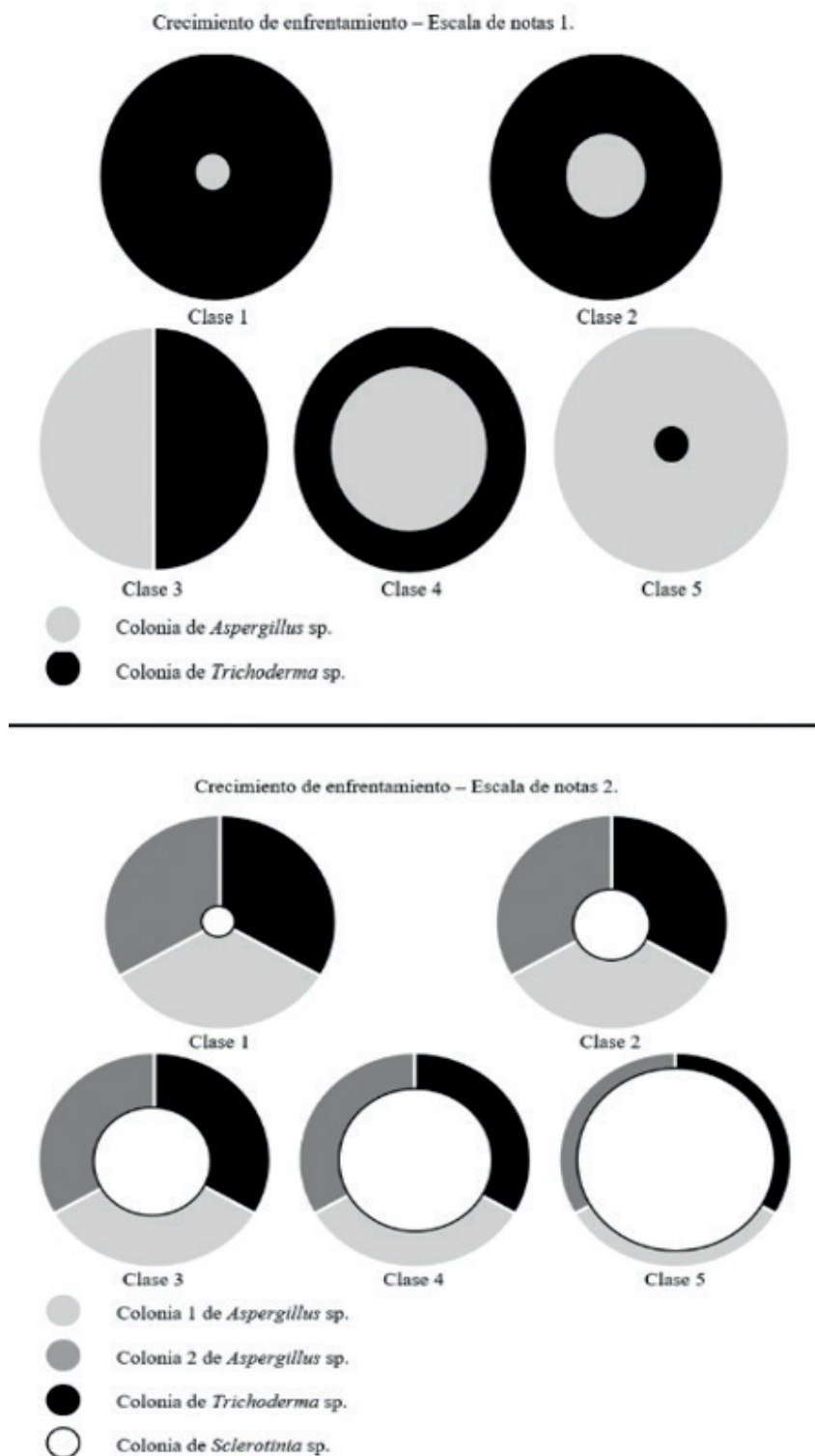
Posteriormente, se evaluó el efecto antagónico entre consorcios de los posibles hongos biocontroladores contra *Sclerotinia* sp., así: Scl vs. Tr1+As1+As2, Scl vs. Tr1+As1+As2, y Scl vs. Tr3+As2+As3. Todas las pruebas de antagonismo se realizaron en los tres medios de cultivo y se incubaron por diez días a 25°C. Como control del crecimiento para cada hongo se sembró en los tres medios mencionados por punción central individualmente, y se comparó el crecimiento con lo observado en cada enfrentamiento. Para evaluar el efecto antagonista entre cada hongo y los consorcios frente al fitopatógeno, se definió una segunda escala de notas (Cuadro 2 y Figura 1) de acuerdo con el método de similaridad de Jaccard [35].

Cuadro 1. Escala de notas para valorar el antagonismo entre *Trichoderma* sp. y *Sclerotinia* sp.

Clase	Característica	Valoración binaria
1	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> : colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia de <i>Aspergillus</i> .	1
2	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> : colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio.	1
3	Sobrecrecimiento de <i>Aspergillus</i> : colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia de <i>Trichoderma</i> .	0
4	Sobrecrecimiento de <i>Aspergillus</i> : colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio.	0
5	<i>Trichoderma</i> y <i>Aspergillus</i> : colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3). Uno no se sobrepuso al otro.	0

Cuadro 2. Escala de notas para valorar el antagonismo entre los consorcios y *Sclerotinia* sp.

Clase	Característica	Valoración binaria
1	Sobrecrecimiento del antagonista o consorcio, que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno.	1
2	Sobrecrecimiento del antagonista o consorcio, que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio.	1
3	El antagonista o consorcio y el patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3). Uno no se sobrepuso al otro.	0
4	El hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión por el antagonista o consorcio.	0
5	Sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio.	0

Figura 1. Distribución de crecimiento en cajas de Petri de acuerdo con las escalas de notas 1 y 2.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se aplicó un diseño experimental basado en la clasificación de conglomerados jerárquicos con medida de similitud de Jaccard [28], donde se distinguieron las relaciones entre cada una de las cepas Tr1, Tr2, Tr3, As1, As2, As3 y Scl. En la escala de similitud se obtuvieron datos binarios, en donde cero hizo referencia a que no hubo un antagonismo mayor al 50%. En la escala de Notas 1, son las clases 2, 4 y 5; y para la escala de notas 2, son las clases 3, 4 y 5. La valoración uno (1) fue para el antagonismo igual o superior al 50%, lo que correspondió en la escala de notas 1 a las clases 1 y 3; para la escala de notas 2, las clases 1 y 2 (Figura 1).

Por último, la distribución normal de los datos se verificó mediante una prueba de Shapiro-Wilk (p -valor $> 0,05$) y el estadístico de Levene (p -valor $< 0,05$). Se determinó también el porcentaje de relación, y se comprobó el grado de similitud mediante el método de Jaccard. Se utilizó un análisis de varianza de una vía y la prueba Tukey para estudiar las diferencias entre las variables consideradas. Todos los análisis fueron realizados mediante el programa informático SPSS V.19.

RESULTADOS

Cepas fúngicas

Los hongos *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. encontrados en los suelos rizosféricos son cosmopolitas ampliamente conocidos [36, 37]. En particular, el hongo *Trichoderma* sp., que desde hace décadas se conoce por sus propiedades como biocontrolador y capacidad de generar lisis en las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, como en los esclerocios por las enzimas quitinasas, proteasas y glucanasas. Igualmente, secretan diversos metabolitos con acción antibiótica, que suministran tolerancia a condiciones estresantes y favorecen la competencia por espacio y sustrato [15, 17, 33]. En relación con *Aspergillus* sp., son pocos los estudios que han evaluado este hongo como biocontrolador [36, 37], siendo un campo que debe seguir profundizándose. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en las especies fitopatógenas, contaminantes de alimentos, generadoras de enfermedades en humanos y animales; como también en especies con aplicación biotecnológica para la producción de enzimas como las xilanasas, amilasas, pectinasas o de metabolitos como ácidos orgánicos y proteínas homologas y/o heterólogas [38, 39].

De las tres zonas de muestreo se obtuvieron e identificaron seis aislados de hongos, tres del género *Trichoderma* sp. y las restantes al género *Aspergillus* sp. Dichos aislamientos se incorporaron a la colección de hongos del laboratorio de microbiología y bioprospección medioambiental -MiBioMA- de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y se identificaron como: Tr1, Tr2 y Tr3 para las cepas de *Trichoderma* sp.; y As1, As2 y As3, para las cepas de *Aspergillus* sp. La obtención del hongo *Sclerotinia* sp., Scl, fue exitoso a partir de esclerocios posterior al proceso de desinfección como fue descrito.

Luego del proceso de aislamiento de los hongos, se determinó el crecimiento de cada uno en los medios de evaluación (Cuadro 3) y en los 10 días de incubación el promedio de crecimiento fue para As1: 8 cm, As2: 7,75 cm, As3: 7,1 cm, Tr1: 7,9 cm, Tr2: 8,05 cm y Tr3: 8,05 cm. Con respecto a la esporulación, en los 10 días de crecimiento se obtuvo un promedio de conidios/mL para As 1: $9,30E+06$, As2: $1,95E+06$, As3: $9,23E+05$, Tr 1: $1,35E+07$, Tr2: $3,33E-07$ y Tr3: $2,14E-07$. Para el caso de Scl, se determinó el número de esclerocios y se obtuvo un promedio de 11 esclerocios/10 días.

Cuadro 3. Crecimientos miceliales en los días 3, 7 y 10 de los aislamientos, esporulación y esclerocios en 10 días de evaluación.

HONGO	MEDIO	Esporulación (conidios/mL) Día 10	Crecimiento día 3 (cm)	Crecimiento día 7 (cm)	Crecimiento día 10 (cm)
As1	PDA	1,90E+06	2,1	5,0	7,1
	AVENA	2,10E+06	2,4	5,7	8,1
	V8	2,50E+06	2,3	5,5	7,8
As2	PDA	1,71E+06	2,1	4,9	7
	AVENA	1,98E+06	2,4	5,5	7,9
	V8	1,91E+06	2,3	5,3	7,6
As3	PDA	8,70E+05	2,1	4,9	7
	AVENA	9,40E+05	2,1	5,0	7,1
	V8	9,10E+05	2,1	4,9	7
Tr1	PDA	1,09E+07	2,2	5,1	7,3
	AVENA	1,23E+07	2,5	5,7	8,2
	V8	1,43E+07	2,3	5,4	7,7
Tr2	PDA	2,91E+07	2,2	5,1	7,3
	AVENA	3,18E+07	2,4	5,7	8,1
	V8	3,34E+07	2,3	5,5	7,8
Tr3	PDA	1,80E+07	2,2	5,1	7,3
	AVENA	2,21E+07	2,4	5,7	8,1
	V8	2,11E+07	2,3	5,5	7,8
HONGO	MEDIO	Esclerocios Día 10	Crecimiento día 3 (cm)	Crecimiento día 7 (cm)	Crecimiento día 10 (cm)
Scl	PDA	9	2,4	5,9	8,1
	AVENA	11	2,7	6,2	9
	V8	10	2,5	5,8	8,6

Las cepas de *Trichoderma* sp. se distinguieron macroscópicamente por no formar borde y por tener un crecimiento difuso en la superficie, similar a un “césped”. Se observó un micelio de color amarillo hasta tonalidades verdes, que con el tiempo se volvió terroso. Microscópicamente, las fálides fueron cortas y ahusadas, como una especie de botella, los conidióforos estaban apartados en ángulo obtuso en relación con las hifas. Los conidios se observaron con forma elíptica a globosa y en forma de racimos, similares a pequeños arboles ramificados.

Las colonias de los aislamientos de *Aspergillus* sp. tuvieron una coloración amarillo oscuro verdoso o marrón y algodonosas; la esporulación fue profusa y las colonias se tornaban granuladas. Microscópicamente, las vesículas fueron pequeñas en forma de cúpula, con méulas sostenidas, fálides en hilera, y cadenas con conidias elípticas y aleuriosporas unidas a hifas sumergidas.

Trichoderma sp. y *Aspergillus* sp. producen enzimas extracelulares capaces de degradar grandes polímeros como la celulosa, la pectina, la lignina y el almidón [37, 38], lo que explica que el mayor crecimiento y esporulación en todos los aislamientos haya sido en el medio de cultivo Miel-Avena, seguido por el medio Jugo V8 y, por último, por el medio PDA. De acuerdo con Di Cologna *et al.* [40], la relación de enzimas excretadas al medio por los hongos *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. varían de acuerdo con las condiciones ambientales y nutricionales respondiendo, con un conjunto de enzimas diferentes en cada situación. De esta manera, la relación de sustratos complejos es proporcional a la producción de enzimas, pero cuando la fuente de carbono es sencilla la producción de enzimas se reprime.

Pruebas de Antagonismo

En el primer enfrentamiento dual se evaluó el efecto antagónico de las cepas de *Aspergillus* sp. As1, As2 y As3 frente a las cepas de *Trichoderma* sp. y se valoró según la escala de notas No. 1 (Cuadro 1). En el Cuadro 4 están las clases luego de valorar el efecto antagónico de cada enfrentamiento allí descrito. Se encontró que el 48,2% de los 27 enfrentamientos correspondieron a un crecimiento masivo de una cepa de *Trichoderma* sp., colonizando la colonia del *Aspergillus* sp. Un 7,41% correspondió al crecimiento masivo de una cepa de *Aspergillus* sp. sobre *Trichoderma* sp. En el 29,6% de los enfrentamientos *Trichoderma* sp. creció en 2/3 de la caja de Petri, y en un 11,1% lo hicieron las cepas de *Aspergillus* sp. Solamente en un 3,70% de los enfrentamientos las colonias crecieron ocupado prácticamente el mismo espacio sin superponerse las colonias (Clase 5, cuadro 1).

Igualmente, se pudo sugerir que la composición de los medios de cultivo influyó en el comportamiento de los promisorios antagonistas de *Sclerotinia* sp. cuando se evalúan conjuntamente y los antagonismos no fueron homogéneos en los 27 enfrentamientos duales. Es decir, en el medio de cultivo PDA la cepa As1 frente a las cepas Tr1 y Tr3 colonizaron aproximadamente 2/3 de la caja; con la cepa Tr2 fue diferente el comportamiento, creciendo en la totalidad de la caja y sobre la colonia As1. En cuanto a la cepa As2, esta creció hasta 1/3 en el medio de cultivo de los Tr1 y Tr2; y en el enfrentamiento con la cepa Tr3, tanto *Aspergillus* sp. como *Trichoderma* sp. crecieron cada uno hasta 1/3 de la caja y las colonias se mantuvieron separadas. Para la cepa As3, en los tres enfrentamientos contra cualquier cepa de *Trichoderma* sp., la colonia fue inhibida en más de un 71,9% (Figura 2).

Los resultados evidenciaron que en el medio de cultivo Jugo V8, el comportamiento fue igual por las cepas Tr1 y Tr2 contra las cepas As1, As2 y As3; creciendo cada *Trichoderma* sp. en toda la superficie del medio y reduciendo la colonia de cada *Aspergillus* sp. según los enfrentamientos. Esto mismo se observó entre en los enfrentamientos de As1 y Tr3, pero el efecto antagónico entre As3 y Tr3 fue que el primero colonizó toda la colonia del segun-

Cuadro 4. Antagonismo entre las cepas de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp.

Código: cepas	Hongos	Clase (Notas 1)		
		PDA	Jugo V8	Miel-Avena
As1 vs. Tr1	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 4	Clase 1	Clase 1
As1 vs. Tr2	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 1	Clase 1	Clase 1
As1 vs. Tr3	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 4	Clase 1	Clase 1
As2 vs. Tr1	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 2	Clase 2	Clase 1
As2 vs. Tr2	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 2	Clase 2	Clase 1
As2 vs. Tr3	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 5	Clase 3	Clase 3
As3 vs. Tr1	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 1	Clase 2	Clase 1
As3 vs. Tr2	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 1	Clase 2	Clase 1
As3 vs. Tr3	<i>Aspergillus</i> sp./ <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 2	Clase 4	Clase 2

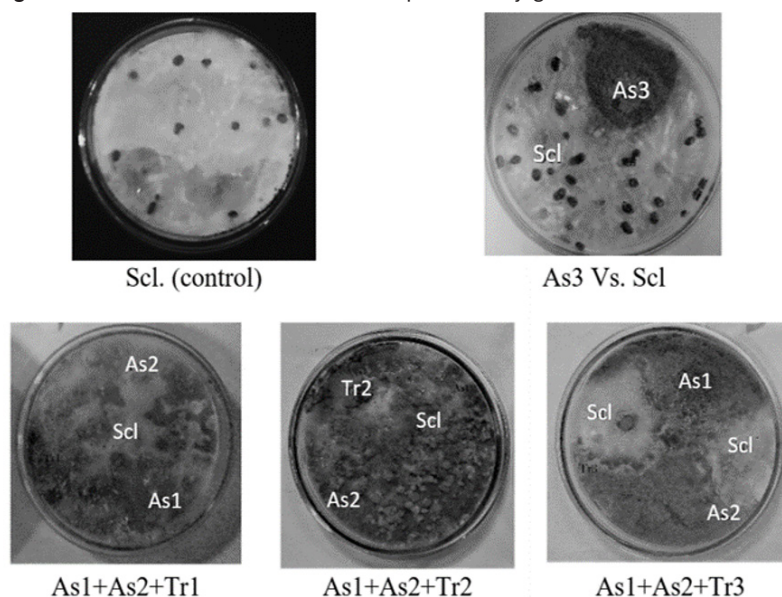
Cuadro 5. Antagonismo entre los promisorios biocontroladores contra *Sclerotinia* sp.

Código: cepas	Hongos	Clase (Notas 2)
As1	<i>Aspergillus</i> sp.	Clase 2
Tr1	<i>Trichoderma</i> sp.	Clase 3
As2	<i>Aspergillus</i> sp.	Clase 2
Tr2	<i>Trichoderma</i> sp.	Clase 1
As3	<i>Aspergillus</i> sp.	Clase 5
Tr3	<i>Trichoderma</i> sp.	Clase 2
As1+As2+Tr1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 2
As1+As2+Tr2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 1
As1+As2+Tr3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.	Clase 3

do, creciendo en toda la caja de Petri. En cuanto al enfrentamiento As2 y Tr3, el *Aspergillus* sp. creció en 2/3 de la caja de Petri y el *Trichoderma* sp. en el espacio restante sin superponerse las colonias.

En relación con los resultados obtenidos al enfrentar los hongos promisorios como biocontroladores contra *Sclerotinia* sp. de manera individual y en consorcios (Cuadro 5), la cepa As3 no tuvo un efecto inhibitorio contra el fitopatógeno, por el contrario, Scl generó hasta un 200% de estructuras de resistencia (Figura 2), por esto no se incluyó en los consorcios. En el enfrentamiento individual las cepas As1, As2 y Tr3 tuvieron un mayor porcentaje de inhibición sobre *Sclerotinia* sp., seguidos con una menor inhibición por la cepa Tr1; pero fue la cepa Tr2 quien logró inhibir en mayor porcentaje el fitopatógeno (Figura 2).

Figura 2. Control de crecimiento *Sclerotinia* sp. en medio jugo V8.



Los resultados evidenciaron que el comportamiento de los consorcios frente al fitopatógeno en los tres medios de cultivo fue similar, y se encontró que el consorcio más eficiente para controlar *Sclerotinia* sp. fue As1+As2+Tr2; en donde se apreció un aumento de la esporulación en el tiempo de la cepa Tr2, seguida por el consorcio As1+As2+Tr1, y el consorcio As1+As2+Tr3. En este último la inhibición de *Sclerotinia* sp. fue hasta 1/3 de la superficie de los medios de cultivo y se apreció como no se superpusieron las colonias entre sí.

En los antagonismos evaluados enfrentando las cepas promisorias como biocontroladores, en un 66,5% fueron dominados por las cepas del hongo *Trichoderma* sp. y en el 23,2% por las cepas del hongo *Aspergillus* sp. Según la literatura, esto puede explicarse por la cantidad de enzimas hidrolíticas tales como las lignocelulolíticas, quitinolíticas, proteolíticas, y glucanolíticas producidas por *Trichoderma* sp., las cuales son excretadas como complejos enzimáticos y están involucradas en procesos como autólisis, germinación de esporas, ramificación y desarrollo de micelios, crecimiento de hifas, nutrición, separación de células y micoparasitismo, procesos esenciales en el control biológico. Igualmente, por la producción de metabolitos secundarios que cumplen funciones de supervivencia para los procesos de competencia, simbiosis, patogenicidad y autoprotección [40, 41]. Los hongos del género *Aspergillus* sp. también se caracterizan por producir enzimas hidrolíticas, la mayoría con gran potencial biotecnológico por su capacidad de degradar paredes celulares de plantas y producir ácidos orgánicos [40].

En los cultivos de los enfrentamientos entre los consorcios y el fitopatógeno no se observó la presencia de esclerocios sin melanina y con melanina, característicos del crecimiento de *Sclerotinia* sp. para su proceso de reproduc-

ción asexual después de los 5 a 7 días de cultivo en los que normalmente se forman, de acuerdo con lo reportado por Sousa-Melo *et al.* [11]. Esto coincidió con los resultados obtenidos, puesto que en el control del fitopatógeno, estas estructuras se formaron a partir del octavo día de incubación. En los tratamientos mencionados no se formaron esclerocios. La disminución del crecimiento del micelo de *Sclerotinia* sp. fue mayor empleando a *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. en consorcios, pero al emplearlos en conjunto se inhibió la formación de esclerocios. Estas estructuras son la principal vía de infección del fitopatógeno y cuando germina puede hacerlo como micelio o cuerpo carpogénico. Asimismo, estas estructuras tienen la capacidad de permanecer viables por largos periodos de tiempo, y son resistentes a cambios adversos físicos y químicos, como a la degradación biológica [42].

La inhibición de *Sclerotinia* sp. por *Trichoderma* sp. ha sido ampliamente estudiado [33, 40-42], pero no ocurre lo mismo con *Aspergillus* sp. donde son pocos los estudios que evalúan el hongo *Aspergillus* sp. como antagonista de fitopatógenos [36, 37]. En este estudio, se pudo evidenciar con los consorcios de los hongos *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. frente a *Sclerotinia* sp., que la eficiencia de inhibición del fitopatógeno causante de la podredumbre blanca es más eficaz al trabajar con metabolitos provenientes de estos dos tipos de hongos. Esto coincide con lo descrito por Cologna *et al.* [40], respecto al uso combinado de diversas enzimas provenientes de cuatro especies de *Aspergillus* sp. con *Trichoderma reesei* para establecer el grado de sacarificación de la cascara de trigo, reportando que fue mayor el grado de sacarificación empleando el coctel de enzimas de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., que cuando la cascara de trigo fue tratada solo con el hongo *T. reesei*. Estos resultados apoyan la conjetura sobre la eficiencia metabólica al emplear combinaciones de enzimas mixtas (i.e., enzimas del metabolismo primario y metabolitos secundarios).

Análisis estadístico

El análisis del conglomerado jerárquico mediante la medida de similaridad de Jaccard permitió establecer la semejanza entre las relaciones antagónicas y su efecto sobre el fitopatógeno. Se obtuvo que en el consorcio As1+As2+Tr1 fueron mutualistas las cepas en un 95,1%, el consorcio solo logró inhibir en un 66,5% el crecimiento de *Sclerotinia* sp. Individualmente, las cepas As1 y Tr1 inhibieron en un 60,6% y en un 91,0% a As2 y Tr1, respectivamente; datos que fueron confirmados al realizar un análisis de varianza de un factor y la prueba Tukey, en donde se pudo encontrar que hubo una asociación entre estas dos cepas de hasta el 60,6% (en promedio), de acuerdo con la semejanza intergrupar realizada con un nivel de confianza del 95%.

Estadísticamente, el comportamiento del consorcio As1+As2+Tr2 fue similar entre las cepas con una eficiencia de inhibición de Scl. del 85,1% en conjunto, y de una inhibición del 95,6% y 95,11% por las cepas As1 y Tr2, respectivamente. Sin embargo, el grado de afinidad por estas dos cepas no fue superior al 9,66%, por lo cual en el tratamiento As1+As2+Tr2 contra Scl. disminuyó hasta un 12,9% el patógeno, de acuerdo con la comparación intergrupar de Tukey (Cuadro 6).

Se evidenció que en el consorcio As1+As2+Tr3, la inhibición no fue superior al 50,0%, aunque las cepas de *Aspergillus* sp. fueron mutualistas entre ellas en un 85,7%. Sin embargo, la cepa Tr3 tuvo un crecimiento inferior al 28,1% y el efecto inhibidor sobre el fitopatógeno individualmente fue superior al 50,0% para cada cepa. Esto se evidenció en la comparación de medias porcentuales referente a la inhibición del fitopatógeno mediante un análisis de varianza y comparación intergrupar con prueba Tukey (Cuadro 7).

Con la prueba estadística de Tukey se corroboró que hubo un porcentaje de asociación del 66,5% entre las cepas As1, As2 y Tr1, y de 87,14% entre las cepas As1 As2 y Tr2; ambos consorcios con un nivel de confianza del 95% (Cuadro 7). Para todos los datos, se realizó una comprobación de homogeneidad, encontrando la correcta distribución de estos y sin variaciones atípicas al estudio realizado.

De acuerdo con el análisis de varianza y la prueba de Tukey, los tratamientos en consorcio fueron semejantes, aportando un grado de inhibición entre el 47,3-85,1%, en donde se pudo encontrar que el cambio de la cepa de *Trichoderma* sp. aportó en mayor o menor grado al control del fitopatógeno, lo cual se observó en los tratamientos individuales contra *Sclerotinia* sp., ya que los hongos As1 y Tr2 fueron mutualistas hasta en un 9,66%, razón

por la cual el tratamiento del consorcio As1+As2+Tr2 solo fue efectivo hasta el 85%. También para As1 y As2, y As2 y Tr2 hubo un grado de afinidad de hasta el 70,9%, en ambas combinaciones.

Cuadro 6. Prueba Tukey enfrentamientos individuales contra *Sclerotinia* sp.

(I) Trat.	(J) Trat.	Diferencia/medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	IC al 95%	
					L. Inf.	L. Sup.
As1	Tr1	41,3%*	0,59%	7,62E-13	39,4%	43,2%
	As2	30,4%*	0,59%	7,62E-13	28,5%	32,3%
	Tr2	-0,44%	0,59%	0,99	-2,32%	1,44%
	As3	83,7%*	0,59%	7,62E-13	81,8%	85,6%
	Tr3	25,1%*	0,59%	7,62E-13	23,2%	26,9%
	Scl	95,1%*	0,59%	7,62E-13	93,2%	96,9%
Tr1	As1	-41,3%*	0,59%	7,62E-13	-43,2%	-39,4%
	As2	-10,8%*	0,59%	7,62E-13	-12,7%	-9,01%
	Tr2	-41,7%*	0,59%	7,62E-13	-43,6%	-39,8%
	As3	42,4%*	0,59%	7,62E-13	40,5%	44,3%
	Tr3	-16,2%*	0,59%	7,62E-13	-18,1%	-14,3%
	Scl	53,7%*	0,59%	7,62E-13	51,8%	55,6%
As2	As1	-30,4%*	0,59%	7,62E-13	-32,3%	-28,5%
	Tr1	10,8%*	0,59%	7,62E-13	9,0%	12,7%
	Tr2	-30,8%*	0,59%	7,62E-13	-32,7%	-29,0%
	As3	53,3%*	0,59%	7,62E-13	51,4%	55,2%
	Tr3	-5,33%*	0,59%	1,95E-8	-7,2%	-3,4%
	Scl	64,6%*	0,59%	7,62E-13	62,7%	66,5%
Tr2	As1	0,44%	0,59%	0,99	-1,4%	2,32%
	Tr1	41,7%*	0,59%	7,62E-13	39,8%	43,6%
	As2	30,8%*	0,59%	7,62E-13	29,0%	32,7%
	As3	84,2%*	0,59%	7,62E-13	82,3%	86,1%
	Tr3	25,5%*	0,59%	7,62E-13	23,6%	27,4%
	Scl	95,5%*	0,59%	7,62E-13	93,6%	97,4%
As3	As1	-83,7%*	0,59%	7,62E-13	-85,6%	-81,8%
	Tr1	-42,4%*	0,59%	7,62E-13	-44,3%	-40,5%
	As2	-53,3%*	0,59%	7,62E-13	-55,2%	-51,4%
	Tr2	-84,2%*	0,59%	7,62E-13	-86,1%	-82,3%
	Tr3	-58,6%*	0,59%	7,62E-13	-60,5%	-56,7%
	Scl	11,3%*	0,59%	7,62E-13	9,44%	13,2%
Tr3	As1	-25,1%*	0,59%	7,62E-13	-26,9%	-23,2%
	Tr1	16,2%*	0,59%	7,62E-13	14,3%	18,1%
	As2	5,33%*	0,59%	1,95E-8	3,44%	7,21%
	Tr2	-25,5%*	0,59%	7,62E-13	-27,4%	-23,6%
	As3	58,6%*	0,59%	7,62E-13	56,7%	60,5%
	Scl	70,0%*	0,59%	7,62E-13	68,1%	71,8%
Scl	As1	-95,1%*	0,59%	7,62E-13	-96,9%	-93,2%
	Tr1	-53,7%*	0,59%	7,62E-13	-55,6%	-51,8%
	As2	-64,6%*	0,59%	7,62E-13	-66,5%	-62,7%
	Tr2	-95,5%*	0,59%	7,62E-13	-97,4%	-93,6%
	As3	-11,3%*	0,59%	7,62E-13	-13,2%	-9,44%
	Tr3	-70,0%*	0,59%	7,62E-13	-71,8%	-68,1%

Cuadro 7. Prueba Tukey consorcios contra *Sclerotinia* sp.

(I) # Trat.	(J) # Trat.	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Lím. Inf.	Lím. Sup.
Scl	As1+As2+Tr1	-64,4% [*]	0,71%	1,08E-12	-66,4%	-62,4%
	As1+As2+Tr2	-85,1% [*]	0,71%	1,08E-12	-87,1%	-83,1%
	As1+As2+Tr3	-47,3% [*]	0,71%	1,08E-12	-49,3%	-45,2%
As1+As2+Tr1	Scl	64,4% [*]	0,71%	1,08E-12	62,4%	66,4%
	As1+As2+Tr2	-20,6% [*]	0,71%	1,09E-12	-22,7%	-18,6%
	As1+As2+Tr3	17,1% [*]	0,71%	1,34E-12	15,1%	19,1%
As1+As2+Tr2	Scl	85,1% [*]	0,71%	1,08E-12	83,1%	87,1%
	As1+As2+Tr1	20,6% [*]	0,71%	1,09E-12	18,6%	22,7%
	As1+As2+Tr3	37,7% [*]	0,71%	1,08E-12	35,7%	39,8%
As1+As2+Tr3	Scl	47,3% [*]	0,71%	1,08E-12	45,2%	49,3%
	As1+As2+Tr1	-17,1% [*]	0,71%	1,34E-12	-19,1%	-15,1%
	As1+As2+Tr2	-37,7% [*]	0,71%	1,08E-12	-39,8%	-35,7%

Por otro lado, las cepas As2 y Tr1 fueron mutualistas hasta en un 90,9%, sin embargo, As1 y Tr1 se inhibieron entre sí en un 60,6%, por lo que el consorcio As1+As2+Tr1 solo logró un grado de efectividad de hasta el 66,5%. Por último, Tr3 fue mutualista con As1 y As2 en 76,8% y 7,21%, respectivamente, por esta razón, el grado de control de este consorcio sobre el fitopatógeno disminuyó considerablemente hasta el 47,1%. No obstante, cabe resaltar que en este último tratamiento tampoco se formaron estructuras de resistencia (esclerocios), pero sí un mayor crecimiento del micelio de Scl.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la mejor combinación de las cepas de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. para controlar el crecimiento de *Sclerotinia* sp. *in vitro*, aislado de lechugas enfermas por este fitopatógeno, es el consorcio As1+As2+Tr2 (eficiencia de inhibición = 85,1%), clasificación clase 1 en la escala de notas 2 modificada. Adicionalmente, en el enfrentamiento individual las mejores cepas con efecto antagonístico contra el fitopatógeno *Sclerotinia* sp., posiblemente son las cepas Tr2 y As1 de los géneros *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. con una inhibición del 95,6% y 95,1%, respectivamente, cada una de acuerdo con el análisis de similaridad de Jaccard. La inhibición de los esclerocios de *Sclerotinia* sp. por los consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. es probablemente una reducción de la patogenicidad del hongo al romper el ciclo infeccioso.

Finalmente, es relevante continuar estudiando los mecanismos de antagonismo de las cepas As1, As2 y Tr2 sobre *Sclerotinia* sp., la asociación metabólica del consorcio y la evaluación *in vivo* del consorcio como control biológico de *Sclerotinia* sp. en cultivos de lechuga (*Lactuca sativa*) para establecer su viabilidad y ecotoxicidad al pensar en un producto biológico que pueda ser empleado en el control integrado del manejo de plagas de cultivos de lechuga.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CIDC) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por la financiación del proyecto código: 3-180-241-11.

REFERENCIAS

- [1] JIMENEZ-SANTOS, JOSÉ-ESTALIN. Aplicación de cuatro dosis de fertilizante (micromate calcium fortified) a base de micro elementos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad great lakes 659, bajo condiciones agroecológicas en la provincia de Lamas [Bachelor Thesis]. Tarapoto (Perú): Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ciencias Agrarias, 2016, 71 p.
- [2] KIM, MOO-JUNG; MOON, YOUYOUN; TOU, JANET; MOU, BEIQUN; WATERLAND, NICOLE. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 49, 2016, p. 19-34.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- [3] PARISMORENO-RIVAS, LAURA. Evaluación de tres niveles de nitrato de potasio en lechuga *Lactuca sativa* L. cultivado bajo sistema de producción hidropónica [Bachelor Thesis]. Guayaquil (Ecuador): Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil, 2017, 77 p.
- [4] ASSEFA, AWRARIS-DERBIE; CHOI, SUSANNA; LEE, JAE-EUN; SUNG, JUNG-SOOK; HUR, ON-SOOK; RO, NA-YOUNG; LEE, HO-SUNG; JANG, SUK-WOO; RHEE, JU-HEE. Identification and quantification of selected metabolites in differently pigmented leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars harvested at mature and bolting stages. *BMC Chemistry*, v. 13, n. 56, 2019, p. 1-15.
<https://doi.org/10.1186/s13065-019-0570-2>
- [5] COLOMBIA. AGRONET-MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Reporte: área. Producción, rendimiento y participación municipal en el departamento por cultivo [online]. 2020.
<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=4> [citado 29 de septiembre de 2020].
- [6] COLOMBIA. AGRONET-MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Reporte: área, producción y rendimiento nacional por cultivo [online]. 2020. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> [citado 29 de septiembre de 2020].
- [7] PÉREZ, SILVIA-LILIAM; PIEDRAHÍTA, WILSON; ARBELÁEZ, GERMÁN. Patogénesis de la pudrición blanda de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 3, n. 2, 2009, p. 262-274.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2009v3i2.1217>
- [8] AZEVEDO, LUCIANA; CHAGAS-PAULA, DANIELA-APARECIDA; KIM, HYEMEE; MONTEIRO-ROQUE, ALINA-CRISTINA; TRANCHES-DIAS, KRIS-SIMONE; CRUZ-MACHADO, JOSÉ; GOMES-SOARES, MARISSI; MERTENS-TALCOTT, SUSANNE. White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), friend or foe: Cytotoxic and mutagenic activities in vitro and in vivo. *Food Research International*, v. 80, 2016, p. 27-35.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.029>
- [9] SUN, GUANGZHENG; YAO, TUO; FENG, CHANJING; CHEN, LONG; LI, JIANHONG; WANG, LIDE. Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. *Biological control*, v. 104, 2017, p. 35-43.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.008>
- [10] DELGADO-ORTIZ, JUAN-CARLOS; OCHOA-FUENTES, YISA-MARÍA; BELTRÁN-BEACHE, MARIANA; CERNA-CHÁVEZ, ERNESTO. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del extracto de *Heliopsis longipes* en cepas de *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, v. 9, n. 2, 2018, p. 871-877.
<http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i4.337>
- [11] SOUSA-MELO, BRUNA; VOLTAN, ALINE-RAQUEL; ARRUDA, WALQUIRIA; CARDOSO-LOPES, FABYANO-ALVARES; CASTRO-GEORG, RAPHAELA; ULHOA, CIRANO-JOSÉ. Morphological and molecular aspects of sclerotial development in the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiological Research*, v. 229, 2019, p. 126326.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126326>
- [12] ARGÜELLO-ARIAS, HELIODORO. Producción limpia de lechuga: cartilla para productores. 1 ed. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2011, 23 p.
- [13] BERNARDINO-HERNÁNDEZ, HÉCTOR-ULISES; MARIACA-MÉNDEZ, RAMÓN; NAZAR-BEUTELSPACHER, AUSTREBERTA; ÁLVAREZ-SOLÍS, JOSÉ-DAVID; TORRES-DOSAL, ARTURO; HERRERA-PORTU-

- GAL, CRISPÍN. Conocimientos, conductas y síntomas de intoxicación aguda por plaguicidas entre productores de tres sistemas de producción agrícolas en los altos de Chiapas, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, v. 35, n. 1, 2019, p. 7-23.
<http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2019.35.01.01>
- [14] STENBERG, JOHAN. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 9, 2017, p. 759-769.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010>
- [15] DE SILVA, NIMALI; BROOKS, SIRAPRAPA; LUMYONG, SAISAMORN; HYDE, KEVIN. Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, v. 33, n. 2, 2019, p. 133-148.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- [16] PINTO-DA SILVA, GERARDA-BEATRIZ; HECKLER, LEISE-INES; DURIGON, MIRIA; DOS SANTOS, RICARDO-FELICIANO; LOVATO, MAIKE; FINGER, GEÍSA; BLUME, ELENA. Biological control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in lettuce using Brazilian *Trichoderma* spp. Strains. *Australian Journal of Crop Science*, v. 13, n. 6, 2019, p. 803-809.
- [17] SEGARAN, GAYATHRI; SATHIAVELU, MYTHILI. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, 2019, p. 1-17.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>
- [18] YANG, FAN; ABDELNABBY, HAZEM; XIAO, YANNONG. A mutant of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* [3] is a novel biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbial pathogenesis*, v. 89, 2015, p. 169-176.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.012>
- [19] ELSHESHTAWI, MOHAMED; ELKHAKY, MAGED; SAYED, SHABAN; BAHKALI, ALI; MOHAMMED, ARIF; GAMBHIR, DIKSHIT; MANSOUR, AREF; ELGORBAN, ABDALLAH. M. Integrated control of white rot disease on beans caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using Contans® and reduced fungicides application. *Saudi journal of biological sciences*, v. 24, n. 2, 2017, p. 405-409.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.038>
- [20] SABATÉ, DANIELA; PÉREZ-BRANDAN, CAROLINA; PETROSELLI, GABRIELA; ERRA-BALSELLS, ROSA; AUDISIO, CARINA. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological research*, v. 211, 2018, p. 21-30.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.003>
- [21] SUN, ZHAN-BIN; WANG, QI; ZHANG, UN; JIANG, WEI-ZHI; LI, SHI-DONG; MA, GUI-ZHEN; SUN, MAN-HONG. The transcription factor-encoding gene *crtf* is involved in *Clonostachys chloroleuca* mycoparasitism on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiological research*, v. 210, 2018, p. 6-11.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.002>
- [22] CLINE, MARLIN. Principles of soil sampling. *Soil Science*, v. 58, n. 2, 1944, p. 275-288.
- [23] JAKLITSCH, WALTER. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species". *Studies in mycology*, v. 63, 2009, p. 1-91.
10.3114/sim.2009.63.01
- [24] JAKLITSCH, WALTER. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal diversity*, v. 48, n. 1, 2011, p. 1-250.
10.1007/s13225-011-0088-y
- [25] ZHU, Z.X.; ZHUANG, W.Y. *Trichoderma* (*Hypocrea*) species with green ascospores from China. *Persoonia*, v. 34, 2015, p. 113-129.
10.3767/003158515X686732
- [26] SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, v. 78, 2014, p. 141-173.
10.1016/j.simyco.2014.07.004
- [27] SKLENÁŘ, F.; JURJEVIC, Z.; ZALAR, P.; FRISVAD, J.C.; VISAGIE, C.M.; KOLARIK, M.; HOUBRAKEN, J.; CHEN, A.J.; YILMAZ, N.; SEIFERT, K.A.; COTON, M.; DÉNIEL, F.; GUNDE-CIMERMAN, N.; SAMSON, R.A.;

- PETERSON, S.W.; HUBKA, V. Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section *Restricti*. *Studies in mycology*, v. 88, 2017, p. 161-236.
[10.1016/j.simyco.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.002)
- [28] MORENO, CARLOS-ANDRÉS; COTES-PRADO, ALBA-MARINA. Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de la lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*). 1ª ed. Bogotá (Colombia): CORPOICA, 2010, 80 p.
- [29] SÁNCHEZ-COLÍN, M.J. Microbiología de suelos: Técnicas, métodos y medios de cultivo. 1ª ed. México D.F. (México): Universidad Nacional Autónoma de México, 2004, 53 p.
- [30] SAHARAN, G.S.; MEHTA, NARESH. *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer Science & Business Media B.V., 2008, 531 p.
- [31] VAILLANT-FLORES, DAYMARA; ALMÁNDOZ-PARRADO, JULIA; GATO-CÁRDENAS, YOANA; RAMÍREZ-OCHOA, REBECA; DÍAZ-RODRÍGUEZ, JOSÉ-ANTONIO. Establecimiento de *Trichoderma* spp. en sustratos orgánicos empleados en casas de postura de Tecnología de Cultivo Protegido. *Fitosanidad*, v. 20, n. 2, 2016, p. 95-96.
- [32] ROYSE, D.J.; RIES, S.M. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, v. 6882, 1978, p. 603-607.
- [33] GUIGÓN-LÓPEZ, CÉSAR; GUERRERO-PRIETO, VÍCTOR; VARGAS-ALBORES, FRANCISCO; CARVAL-MILLÁN, ELIZABETH; ÁVILA-QUEZADA, GRACIELA-DOLORES; BRAVO-LUNA, LETICIA; RUOCCO, MICHELINA; LANZUISE, STEFANIA; WOO, SHERIDAN; LORITO, MATTEO. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, v. 28, n. 2, 2010, p. 87-96.
- [34] MELLO, SUELI-CORRÊA, ÁVILA, ZILA; LEONARDO-MINARE, BRAÚNA; PÁDUA, RAQUEL; GOMES, DIOGO. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, v. 11, n. 1, 2007, p. 3-9.
- [35] VEGA-DIENSTMAIER, JOHANN-MARTÍN; ARÉVALO-FLORES, MARTÍN. Clasificación mediante análisis de conglomerados: un método relevante para la psiquiatría. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, v. 77, n. 1, 2014, p. 31-39.
- [36] EL-SAYED, ASHRAF; SHAD-ALI, GUL. *Aspergillus flavipes* is a novel efficient biocontrol agent of *Phytophthora parasitica*. *Biological control*, v. 140, 2020, p. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104072>
- [37] EL-DEBAIKY, SAMAH. Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus pipe-riis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum*. *Microbial pathogenesis*, v. 113, 2017, p. 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.041>
- [38] PARK, HEE-SOO; JUN, SANG-CHEOL, HAN, KAP-HOON; HONG, SEUNG-BEOM; YU, JAE-HYUK. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Advances in applied microbiology*, v. 100, 2017, p. 161-202.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>
- [39] KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.V.; VAN VELUW, G.J.; WANG, F.; MÜLLER, W.H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H.A.B. Development in aspergillus. *Studies in mycology*, v. 74, 2013, p. 1-29.
<https://doi.org/10.3114/sim0006>
- [40] DI COLOGNA, NICHOLÁS-DE MOJANA; GÓMEZ-MENDOZA, DIANA-PAOLA; FONSECA-ZANOELO, FABIANA; GIANNESI, GIOVANA-CRISTINA; DE ALENCAR-GUIMARAES, NELCIELE-CAVALIERI; DE SOUZA-MOREIRA, LEONORA-RIOS; FERREIRA-FILHO, EDIVALDO-XIMENES; ORNELAS-RICART, CARLOS-ANDRÉ. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and microbial technology*, v. 109, 2018, p. 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2017.08.007>
- [41] ZEILINGER, SUSANNE; GRUBER, SABINE; BANSAL, RAVINDRA; MUKHERJEE, PRASUN. Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. *Fungal biology reviews*, v. 30, n. 2, 2016, p. 74-90.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- [42] SMOLIŃSKA, URSZULA; KOWALSKA, BEATA. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* -- a review. *Journal of Plant Pathology*, v. 100, 2018, p. 1-12.
<https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>

Relative humidity effect on encapsulation properties of coproducts obtained from wet milling of amaranth grain*

Efecto de la humedad relativa en la capacidad encapsulante de los coproductos de la molienda húmeda del grano de amaranto

Efeito da umidade relativa sobre a capacidade de encapsulamento dos co-produtos da retificação húmida do grão amaranto

ROA-ACOSTA, DIEGO-FERNANDO¹; NIETO-CALVACHE, JHON-EDINSON²; AGUDELO- LAVERDE, LINA-MARCELA³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 30 de Septiembre 2019.

Aprobado para publicación: 13 de Febrero 2020.

* Proyecto de investigación de origen: "Diseño básico de un prototipo de alimento funcional a base de péptidos obtenidos de la quinua en el Cauca". Financiación: Beca doctoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas-CONICET (2011-2015), Universidad del Cauca. Finalización: 2019.

- 1 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA). Ph.D. Química Industrial. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7198-9827>
- 2 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación Aprovechamiento de Subproductos y Residuos Agroindustriales (ASUBAGROIN). Ph.D. Química Industrial. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1886-4176>
- 3 Universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Agroindustriales, Grupo de investigación en Procesos Agroindustriales (PAI). Ph.D. Química Industrial. Armenia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1966-8636>

Correspondencia: droa@unicauca.edu.co

ABSTRACT

The co-products of the amaranth starch extraction have recently aroused the interest of the industry, mainly due to their functional characteristics. In this paper, the encapsulating efficiencies of starch-enriched fraction (SEF) and native starch (NS) obtained, respectively, by dry or wet milling were studied. The storage humidity effect (11 to 84%, 21 days) on β -carotene retention were evaluated. Significant effects of amaranth protein present in SEF matrix on emulsification and subsequent retention of β -carotene were found. The best encapsulation performance was showed by ball milled starch enriched fraction (SEF-BM) fraction, with up to three times of total β -carotene content in comparison with the NS containing matrices. The glass transition temperature (T_g) of the samples decreased with the increase in relative humidity due to the plasticizing effect of the water. The starch-enriched amaranth fraction showed a high technological potential as an encapsulating agent and its own protein content served as a good emulsifier-stabilizer.

RESUMEN

Los coproductos de la extracción del almidón de amaranto han despertado recientemente el interés de la industria, principalmente debido a sus características funcionales. En este trabajo se investigó la eficiencia de encapsulación de una harina (SEF) y el almidón nativo (NS) obtenidos mediante molienda abrasiva y húmeda, respectivamente. Se evaluaron los efectos de la humedad de almacenamiento (11 a 84%, por 21 días) sobre la retención del β -caroteno encapsulado y superficial. Se encontraron efectos significativos de la proteína de amaranto presente en la harina molida SEF-BM sobre la emulsificación y la posterior retención de β -caroteno. La matriz SEF-BM mostró el mejor rendimiento de encapsulación, con tres veces el contenido total de β -caroteno en comparación con las matrices que contenía NS. La temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras disminuyó con el aumento de la humedad relativa debido al efecto plastificante del agua, lo que provocó un aumento en su movilidad. El coproducto SEF mostró un alto potencial tecnológico como agente encapsulante y sus proteínas nativas sirvieron como un buen estabilizador emulsionante.

RESUMO

As frações de amido de amaranto despertaram recentemente o interesse da indústria, principalmente devido às suas características funcionais. Avaliou-se a eficiência de encapsulação da fração enriquecida com amido (SEF) e amido nativo (NS) obtidos, respectivamente, por moagem seca e úmida. Os efeitos da umidade de armazenamento (11 a 84%, 21 dias) na retenção de β -caroteno foram

KEY WORDS:

Encapsulating Agent; β -carotene; Amaranth Starch; Amaranth Flour; Planetary Ball Milling; Wet milling; Carotenoids.

PALABRAS CLAVES:

Agente Encapsulante; β -caroteno; Almidón de Amaranto; Harina de Amaranto; Molino Planetario; Molienda húmeda; Carotenoides.

PALAVRAS CHAVES:

Agente Encapsulante; β -caroteno; Amido de Amaranto; Farinha de Amaranto; Moinho Planetário; Retificação húmida; Carotenóides.

Cómo citar este artículo: ROA-ACOSTA, DIEGO-FERNANDO; NIETO-CALVACHE, JHON-EDINSON; AGUDELO-LAVERDE, LINA-MARCELA. Relative humidity effect on encapsulation properties of coproducts obtained from wet milling of amaranth grain. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 32-44. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)32-44](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)32-44)

investigados. Efeitos significativos da proteína de amaranto presentes na matriz do SEF na emulsificação e subsequente retenção de β -caroteno foram encontrados. A matriz SEF apresentou o melhor desempenho de encapsulação, com até três vezes o conteúdo total de β -caroteno comparado às matrizes contendo NS. A temperatura de transição vítrea (T_g) das amostras diminuiu com o aumento da umidade relativa devido ao efeito plastificante da água, o que causou um aumento na mobilidade neles. A fração de amaranto enriquecida com amido apresentou alto potencial tecnológico como agente encapsulante e suas proteínas nativas serviram como um bom estabilizante emulsificante.

INTRODUCTION

Carotenoid pigments are a group of compounds widely distributed in the nature and are responsible for the yellow, orange and red color of fruits and vegetables. The β -carotene is an important member of the carotenoid family, which is present in many fruits and vegetables such as carrots, squash, papaya, carambola, peach, spinach, broccoli, cabbage, among others [1, 2]. Currently, the greatest interest in the carotenes is not only due to their pro-vitamin A activity, but also because of its diet antioxidant action, since it is able to trap and eliminate free radicals, reducing oxidative stress in the body [3]. In this way, when carotenes are incorporated into food to generate some color or to impart a functional characteristic, these remain exposed to isomerization and oxidation processes that can alter them. A possible solution to prevent this problem could be the microencapsulation, a technique commonly used to increase the carotenoids stability [4].

Microencapsulation is a technique where sensitive ingredients are packed inside a lining material, which protects the sensitive ingredient from adverse reactions, prevents the volatile ingredients lost and allows to control the encapsulated ingredient release [5]. Microencapsulation has important applications in the food industry as a protective of flavors and vitamin and other sensitive food ingredients. Various techniques for functional ingredient microencapsulation have been developed, which have been classified according to the nature of the method employed. There are physical procedures that require the mechanical mixing of the active component with the encapsulating component followed by evaporation of the dispersing medium [6]; chemical processes that are based on chemical and molecular structure and, affinity between the active component and the encapsulating agent. The following are some processes used for encapsulation: coacervation, molecular inclusion, spray drying and freeze drying, among others.

Spray drying and freeze drying are the methods commonly used to encapsulate food ingredients [6]. Through these methods, powder is obtained from of a liquid mixture, producing particles that protect the active material in matrices generally formed by polymers. These techniques are basically performed in three steps: emulsion preparation, homogenization and solvent removal. The first step is to disperse the active material in an agent encapsulant solution with which it is immiscible, the encapsulant material must have good emulsification properties, low viscosity, high solids content, in order to reducing the drying time, forming a film with a high content of solids around the drops of active material and increase its retention [7]. The second step is the homogenization of the emulsion, which consists of creating small ingredient drops in the encapsulating solution, forming a fine emulsion; sometimes the addition of emulsifying agents is necessary to achieve a good homogenization. Finally, the solvent elimination, which can be given at high temperatures (spray drying for example) or low temperatures (lyophilization). At this stage, the mixture of active agent and encapsulant, already homogenized, enter the drying chamber where simultaneously the solid matrix is formed and the solvent is removed [6,7]. Different cover materials are used in the food industry [8] such as gums, cellulose, proteins, and starches.

Although, gum arabic can be an excellent covering material, due mainly its emulsifying power and volatile retention capacity, it is less industrial used because its high cost and limited sources, promoting the interest to found other alternative materials [9]. The search for partial or total substitutes for gum arabic increased recently, revaluing the use of starch as a coverage material, thanks to its abundance and low cost. However, native starch presents certain functional limitations that affect its efficiency and have restricted its use as an encapsulating agent. To overcome these functionality problems have been proposed modification techniques to adapt the

starch properties to the desirable conditions [10]. Advantage of these materials is their low cost, neutral flavor and good oxidation protection. However, as lacking emulsifying characteristics, several researchers have used this type of materials in combination with emulsifying agents such as gelatin, proteins of the serum and tween 80 [11]. The aim of this work was to evaluate the behavior of β -carotene encapsulated in starchy matrices at different storage humilities.

METHOD

This study was carried out in the laboratories of the department of industries from university of Buenos Aires (Buenos Aires – Argentina) and in the laboratories of the faculty of agricultural sciences of the university of Cauca (Popayan -Colombia). The experimental tests were carried out under conditions at 25°C, 1 atm and 0 msnm (Buenos Aires – Argentina) and 25°C, 824 hPa and 1760 msnm (Popayan)

Abrasive milling

The SEF fraction was obtained by abrasive milling using a laboratory rice mill Suzuki MT-95 (Suzuki, San Pablo, Brazil), which separates automatically pearled amaranth (SEF-starchy fraction yield, 70%) and bran (LPEF-lipid-protein fraction yield, 28%). The milling conditions were determined in preliminary trials (data not shown), where a milling time of 90 minutes was established for a 100 g load.

Wet milling

The amaranth grains (*Amaranthus cruentus*) previously obtained by abrasive milling was milled in a ball mill model PM-100 (Retsch, Haan Mettman, Germany) with one stainless steel milling cylinder (500 mL). The maceration solution of 0,3 g/L of NaOH (NaOH from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 0,2 g/L of sodium dodecyl sulfate (from J. T. Baker Co., New Jersey, USA) was employed with a solution:grain ratio of 1,2:1 (mL:g). Wet-milling conditions were described by [12], after wet milling starch slurry was separated, then slurry was centrifuged and native starch (NS) was obtained, which was quickly frozen using liquid nitrogen (-196°C) and freeze-dried during 48 h at 56°C and 0,04 mbar in at ALPHA 1-4 LD2 freeze dryer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GMBH, Germany). The SEF and NS samples previously obtained by abrasive and wet milling were pulverized in a planetary ball mill model PM-100 (Retsch) obtaining SEF-BM and NS-BM, respectively [12].

Matrices preparation

The (SEF-BM and NS-BM) samples were suspended in distilled water (5% w/w) and heated in a thermostatic bath (Vicking SRL, Buenos Aires, Argentina) at 95°C to gelatinize the starch. Trans- β -carotene in oil was added to the cooled gelatinized starch paste in a ratio of 1:50 g:g on dry basis. The ratio between the core and wall material was chosen based on literature reports [6,11, 13]. The mixture was stirred until complete homogenization employing an Ultra-Turrax T18B (IKA®-WerkeGMBH & CO.KG, Staufen, Germany) at 15.500 rpm for 10 min. Then, the samples were quickly frozen using liquid nitrogen (-196°C) and freeze-dried at same conditions described previously. 0,05% w/w Gelatin (Ge, from Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added to NS systems for generate emulsion.

Determination of the β -carotene content

The procedure for determining surface and encapsulated β -carotene content is based on the concept that β -carotene is lipophilic and soluble in hexane unless the rest of the matrix components. Surface β -carotene was extracted from the freeze-dried samples by washing them with 3 mL of hexane in a glass vial (5 mL) and shook in a Vortex-Genie 2 (Scientific Industry, Inc., Bohemia, New York, USA), at 1850 rpm for 8 min. The supernatant was measured at 452 nm using a spectrophotometer model V-630 UV-VIS (JASCO Inc., Maryland, USA). This wave-

length was found to correspond to maximum absorbance of the spectrum from 200 to 600 nm and is agreement with previous results reported by [14]. The remaining matrix (without surface β -carotene) was dissolved by adding 1,5 mL of water and shook in a Vortex-Genie 2 at 1850 rpm for 2 min, in order to release encapsulated β -carotene. Then, the encapsulated β -carotene was extracted with 3 mL of hexane and shook in a Vortex-Genie 2 at 1850 rpm for 6 min; the hexane fraction was measured at 452 nm. The concentration of β -carotene was calculated according to equation (1) and expressed as (mg/gmatrix). An average value of three replicates was reported along with the standard deviation.

$$\beta - \text{caroten} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3 \times VH}{\epsilon \times l \times SM} \quad (\text{Ec. 1})$$

Where: A is the absorbance at 452 nm, MW is the molecular weight of β -carotene (536,8 g/mol), DF is the dilution factor, VH is the volume of hexane (0,003 L), ϵ is the molar extinction coefficient of β -carotene in hexane (145.300 L/mol cm, Rodríguez-Amaya, 2001), l is the path length (1 cm) and SM is the weight of starchy matrix in dry basis (0,04902 g).

Effect of storage humidity on encapsulated β -carotene

With the purpose to obtain systems with different content of water, the samples were exposed during 21 days at 25°C into vacuum desiccator with controlled relative humidity (RH). The salt solutions used were (analytical quality, Merck): LiCl (RH 11%), MgCl₂ (RH 33%), MgNO₃ (RH 52%), NaCl (RH 75%), KCl (RH 84%) KNO₃ (RH 97%). In relation with the storage samples to 84% RH and 97% RH were exposed for 5 days; to prevent microbial growth. The samples were stored at 25°C in forced air oven SR71 model (FAC SRL, Buenos Aires, Argentina). All samples remained in darkness to avoid any other contribution to β -carotene degradation. The β -carotene concentration (C) was determined in triplicate at selected times. The initial β -carotene content (C₀) was measured immediately after freeze-drying, and the results are expressed as the percent of remaining β -carotene (C/C₀, %).

Determination of water sorption isotherms

The water content was determined gravimetrically by drying at 105°C up to constant weight (AACC 44-16) in forced air oven SR71 model. The results were expressed in dry basis (% d.b). An Aqualab Serie 3 (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA) was employed to determine the water activity. The measures were done at 25°C by triplicate. The water adsorption curve was fitted using the GAB equation.

Differential scanning calorimetric (DSC)

Glass transition temperatures (T_g) of freeze-dried samples SEF-BM and NS-BM humidified at different relative humidity (11 to 97%) were determined employed a Mettler-Toledo DSC model calorimeter 822 (Schwerzenbach, Switzerland), calibrated with indium (156,6°C) lead (327,5°C) and zinc (419,6°C). Sample mass between 10 mg and 15 mg, were employed and the scan rate was 10°C/min.

T_g values obtained were modeled using the Gordon and Taylor equation [15].

$$Tg = \frac{(W1 * Tg1) + (k * W2 * Tg2)}{W1 + k * W2} \quad (\text{Ec. 2})$$

Where T_{g1} and T_{g2} are the starting temperatures of the glass transitions of solids amorphous and pure water respectively, W is the mass fraction of each component (subscript 1 for solids and 2 for water) and k is a constant that characterizes the effect of a second component (in this case water) on the T_g.

Statistical analysis

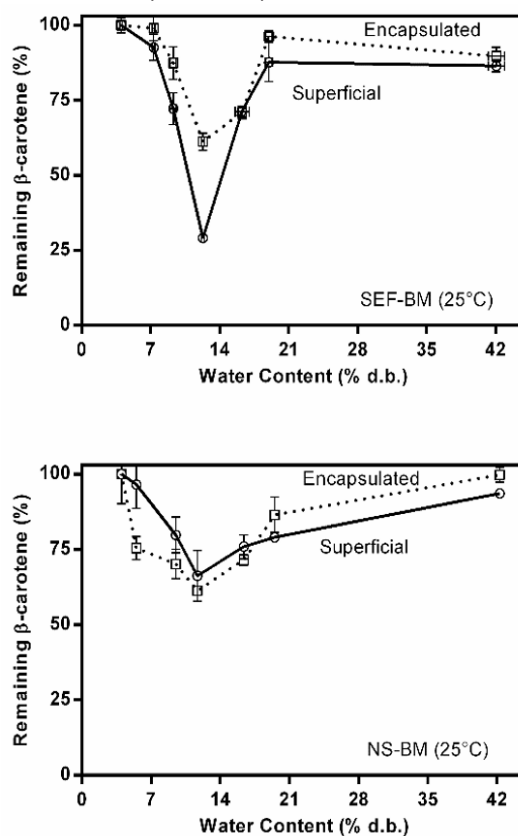
Relative humidity effect on encapsulation properties was evaluated by ANOVA. To compare with control sample, it was used the Dunnet test. To determine the differences between treatments, it was used the Tukey test, using the Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). In some cases, the value-p was calculated using a t-test to analyze the differences between the samples in a more exhaustive way.

RESULTS

The SEF-BM and NS-BM samples were stored at different conditions of relative humidity controlled between 11 and 97%. According to the relative stability diagram shown in [16] the lipid oxidation rate shows an U-type curve, which presents a maximum values in both low and high water activities, and a minimum between 0,3 and 0,5. It is important to point out that the most of the works that evaluate the β -carotene stability of based on water content do so by studying the stability of β -carotene as a function of time once the matrix used reached equilibrium moisture [17]. In present research, the water content influence on the quantity and structure of β -carotene after humidification between 11 and 97% RH was studied, so the results obtained will not obey the typical curve in U, since this corresponds to relative speeds and not to a carotene content.

The figure 1 shown the β -carotene remained content. Both the surface and encapsulated β -carotene were affected in the same way and in a manner dependent on storage humidity, although the encapsulated β -carote-

Figure 1. Behavior of the surface and encapsulated β -carotene remaining in the SEF and SN fractions at different relative humidity at 25°C dry base.



ne content was always higher than the surface β -carotene, showing the protective capacity of the matrix. For both matrices, an area of greater degradation was observed between 9 and 16% d.b (with a minimum of 12% d.b), while the samples stored with higher humidities conserved a greater amount of β -carotene.

The fact that there are no differences between the two matrices analyzed may be due to the fact that the encapsulation and protection mechanisms are the same for both systems. The only difference between them is in the type of proteins they have (those of amaranth grain or gelatin), and obviously this does not affect the stability of β -carotene at different storage humidities. It is important to consider that the samples exposed to 19 and 42% d.b cross the area of maximum deterioration faster, which would explain the higher retention values of β -carotene.

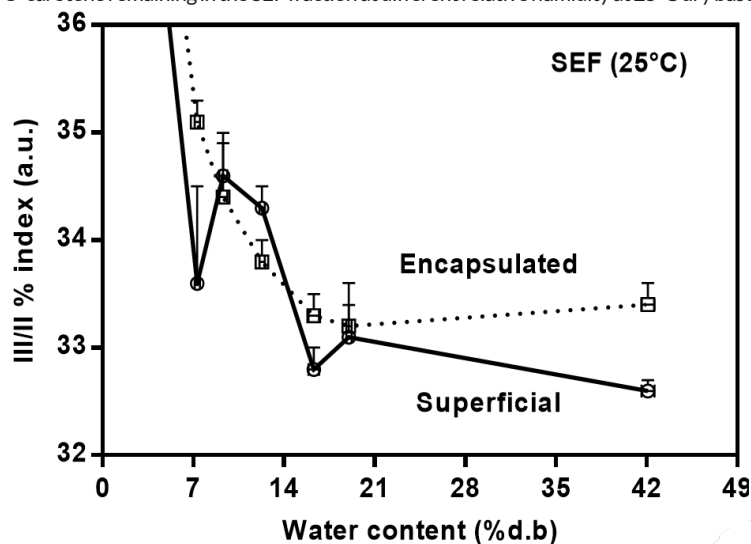
Figure 2 shows the fine structure index (III/ II, %) for the humidified SEF-BM sample. The change in this index is small and similar for both the encapsulated β -carotene and surface β -carotene in the SEF sample.

This makes it clear that deterioration mechanisms observed cause minimal changes in β -carotene (isomerization, in this case), whether it is encapsulated.

That is, structurally, differences in water content would not be affecting the structure of β -carotene from changes produced by isomerizations. On the other hand, it is important to note that there was a slight reduction in the index values in the humidified samples with respect to the control sample (index III / II% of $37,5 \pm 0,5$). This reduction implies that there was an isomerization of β -carotene that could have been caused during the humidification time at 25°C.

Golman *et al.* (1983) demonstrated that the degradation of β -carotene in model matrices of microcrystalline cellulose vacuum dehydrated and subsequently humidified in a range of water contents between 0 and 21% at 35°C is due to the action of the remaining oxygen in the head space after sealing the vials. However, the deterioration evaluated by these authors corresponds to the degradation as a function of time once the vial was sealed after humidification. In that case, the degradation curve obtained is sigmoid, corresponding to a typical autocatalytic chain reaction, where there is a first induction period, a rapid period (propagation) and finally a delay or termination period [17]. The experiments shown in the figures 1 and 2, that the observed deterioration could be due to the oxidation generated by the oxygen in the air to which the samples were exposed when they

Figure 2. Behavior of the stability index III/II (%) of the surface and encapsulated β -carotene remaining in the SEF fraction at different relative humidity at 25°C dry base.



were taken from the lyophilizer. While that exposure was for a very short time, it could have been enough to start the oxidation reaction.

If the degradation kinetics of β -carotene will be studied as a function of humidification time (experiment that would have to be done using as many desiccators as times would be measured, so as not to expose the samples to the air for the time of the test) and if this kinetics followed a degradation curve of the sigmoid form, the degradation mechanism could be corroborated. The figure 3 shows the deterioration caused by oxygen, which is more pronounced for surface β -carotene compared to encapsulated β -carotene. In this case, the oxygen present in the head space was sufficient to cause a large oxidation of the surface carotene. Golman et al. (1983) had observed how the concentration of oxygen (between 1 and 20%) causes an increase in the constant kinetics of degradation of β -carotene.

In order to understand the influence of the structural and physicochemical properties in the matrices on the stability of β -carotene, different properties of sorption, mobility and transition temperatures were analyzed. Water activity and moisture content are parameters considered relevant in food stability, since, being exposed to the relative humidity of the environment can gain or lose moisture to the given equilibrium level. This movement of water, in low humidity products, to reach equilibrium with the surrounding environment is identified with the term sorption and if the process is at a constant temperature it is possible to establish the moisture sorption isotherms. Thus, the isotherms can be moisture adsorption or desorption and graphically correspond to the content of water as a function of water activity (a_w), at a certain temperature.

Figure 4 shows the water sorption isotherms for both SEF-BM and NS-BM samples. Both systems have a similar isotherm to each other with the typical sigmoid form (type II isotherm), characteristic of starch-derived polymers. Figure 4 shows the isotherms adjusted through the GAB model applied. The values obtained from these adjustments are shown in Table 1.

The GAB model takes multilayers conceptually into consideration and is the most widely used method due to its validity range. The GAB equation allows to obtain the monolayer sorption value (q_m), which represents the amount of water that covers the exposed surface of the solid completely with a layer of a thick molecule [18].

The Guggenheim constant C is related to the heat of sorption of the water to the first layer of solid active sites, while the constant k is a factor that corrects the properties of the multilayer water molecules with respect to free water. Sorption values C and k found do not show significant differences between samples and were like those found in other starchy products [19]. Knowing the volume of a water molecule, it is possible to calculate the area of sorption (S_w), which is shown in Table 1. The values obtained showed no significant differences from each other and are in the range of starchy products. Due to the system generation process (lyophilization), the solute molecules were immobilized by rapid freezing and / or rapid dehydration, thereby obtaining an amorphous solid. One of the key parameters of study in dehydrated systems corresponds to the determination of the glass transition temperature (T_g).

The determination of the T_g curve for a sample allows to have a notion of the stability regions for a given system, knowing the zones corresponding to the amorphous state and that of an overcooled liquid or gummy region. The T_g corresponds to the temperature at which the glasses begin to soften and flow [20]. Amorphous solids exist in a non-equilibrium state and exhibit time-dependent changes as they approach equilibrium. The appearance of a vitreous material is that of a brittle rigid solid characterized by a very high viscosity (around 10^{12} to 10^{14} Pa.s) [20]. Molecular mobility in glasses is restricted to vibrations and rotational movements of short range [20]. The changes that occur in the vitreous state, during the so-called "physical aging", are extremely slow and therefore, the systems can be considered stable to physical and chemical changes [21]. At temperatures above T_g , the system passes from the vitreous state to the overcooled liquids, the viscosity decreases from approximately 10^{12} to 10^3 Pa.s, increases molecular mobility and translational movements, and in systems porous structural shrinkage occurs as a result of the decrease in viscosity and increased fluidity of the walls that support its structure. Due

Figure 3. Amount of surface and encapsulated β -carotene after 21 days at 25°C in samples in an atmosphere of 11% relative humidity.

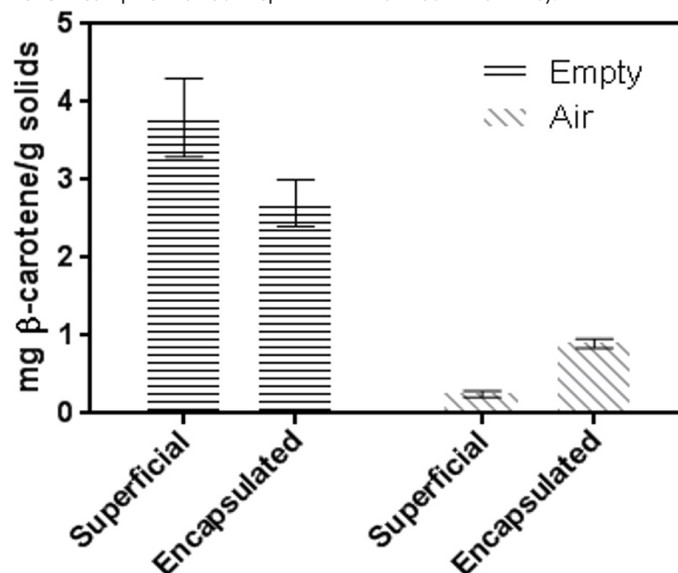


Figure 4. Water sorption isotherm for samples of ground starch fraction (SEF-BM) and native starch with ground gelatin (NS-BM) modeled by GAB.

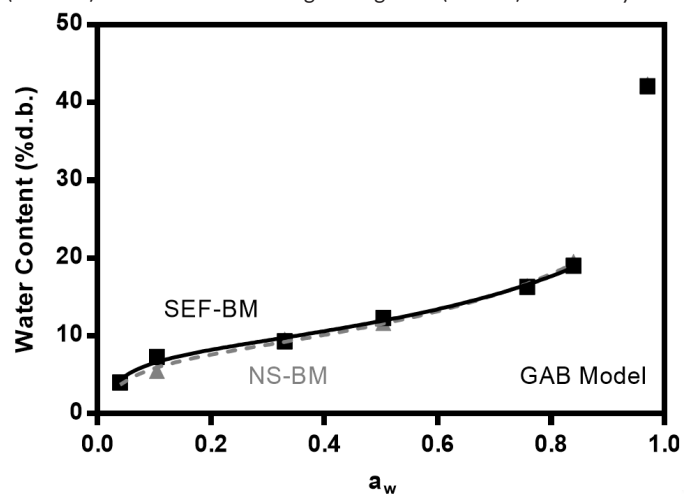


Table 1. Parameters obtained by adjusting the water adsorption isotherms by the GAB model.

Sample	qm	C1	K1	R ²	Sw
SEF-BM	8,3±0,7	38±11	0,68±0,04	0,9935	294±25
NS-BM	7,8±0,4	29±6	0,72±0,03	0,9973	277±14

Standard error is included.

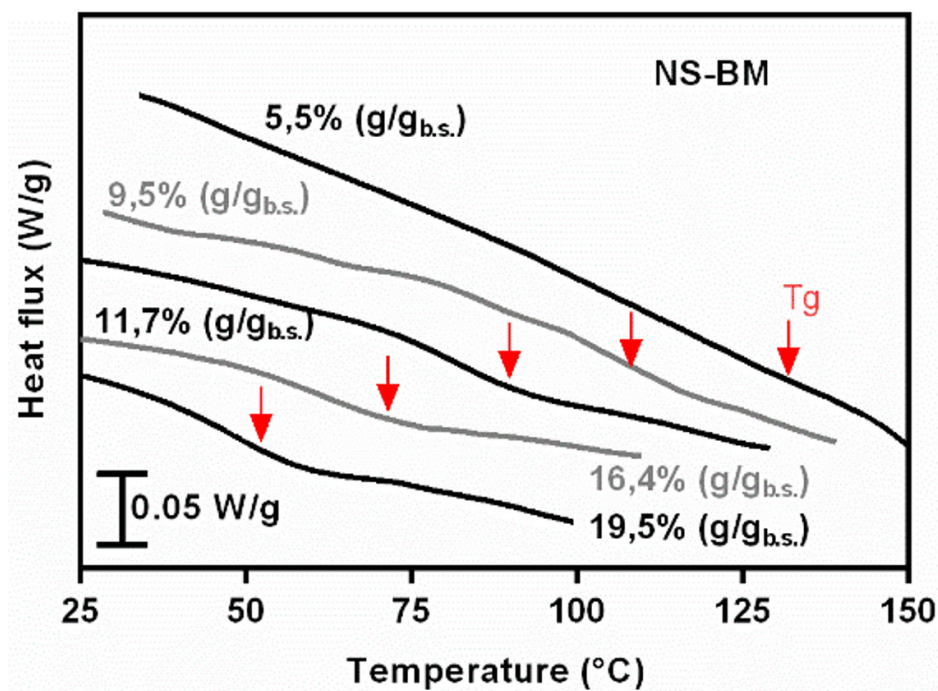
to their potential effect of increasing the diffusion coefficient of the reagents when the glass transition occurs, numerous authors analyzed the effect of the reagent on the kinetics of the chemical reactions controlled by the diffusion of the reagents. Therefore, in order to obtain greater protection from an encapsulated labile agent, it is desirable that the sample is vitreous, since the rate of deterioration reactions will be low and much lower with respect to the gummy state.

Figure 5 shows the rescans of the thermograms obtained by differential scanning calorimetry of the NS-BM samples. These thermograms show a transition that moves at lower temperatures as the water content increases. This transition corresponds to the T_g of the samples, which decreases due to the plasticizing effect of the water, causing an increase in mobility in them. Figure 6 shows the T_g curves obtained for the two systems analyzed as a function of the fraction of water.

As expected, the curves were very similar for the two systems, with high T_g values for the entire range of water contents studied. The data obtained were adjusted with the Gordon and Taylor equation. The T_g values found for ground amaranth starch were $192 \pm 6^\circ\text{C}$, the value of which is consistent (although slightly lower) with the T_g values reported for starches from other sources 243 to 278°C for corn, $166 \pm 9^\circ\text{C}$ for corn grits [22].

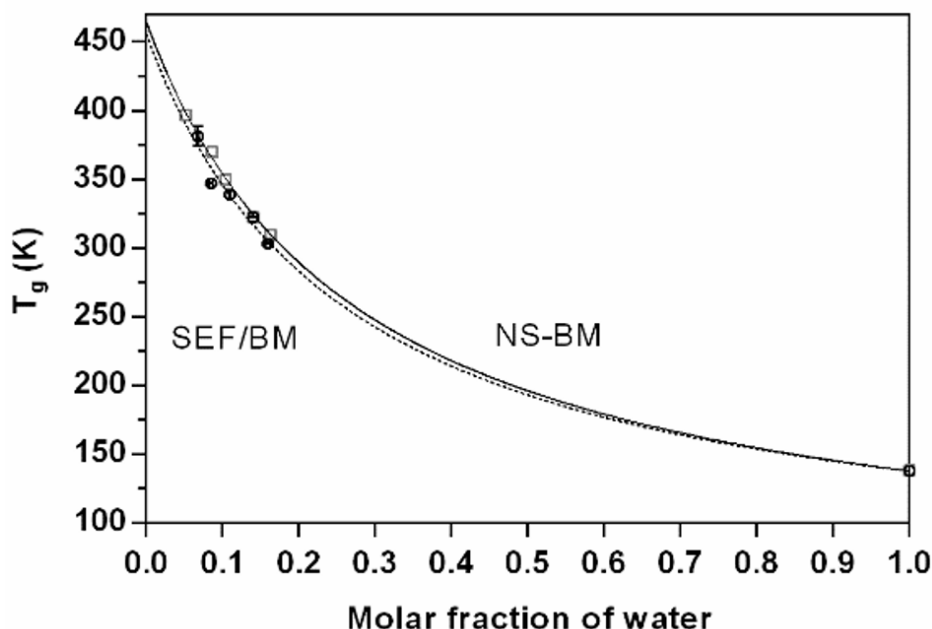
The lower values of T_g found could be due to the reduction in the length of the glucosidic chains, the product of grinding, although this was not confirmed experimentally. The constant k allows to characterize the effect of water on T_g . If the value of the ratio T_{g1}/T_{g2} is high as in this case (the T_g of the second component is much lower than that of the first), k is also, and the second component will have a greater effect on the T_g of the first [23]. The values found coincide with the values reported in the literature for starches, which are in the range 3,8 to 6,2 [22].

Figure 5. Thermograms obtained by differential scanning calorimetry of humidified freeze-dried samples between 11 and 84% relative humidity.



The samples correspond to the systems obtained with native starch treated with ball mill (NS-BM). The thermograms shown correspond to the rescans. Water contents expressed in dry basis (b.s.) are reported.

Figure 6. Glass transition temperature curve (T_g) for samples of ground starch fraction (SEF-BM) and native starch with ground gelatin (NS-BM) modeled by Gordon and Taylor.



Standard deviation is included.

Standard deviation is included.

It is important to note that in the range of 11 to 84% the samples were stored (at 25°C) above their T_g . Therefore, the changes observed in figures 1 and 2 are not a function of a drastic change in the mobility of the system produced by a change of state (from vitreous to gummy) [24]. All changes observed in these figures occurred in the vitreous state, as well as the changes observed during thermal storage [12, 25].

CONCLUSIONS

For both matrices, an area of greater degradation between 33 and 75% RH (with a minimum of 52%) was observed, while samples stored at higher relative humidity retained a greater amount of β -carotene. The fact of not finding differences between the two matrices analyzed may be due to the fact that both the encapsulation mechanism and the protection mechanism are the same for both systems. The only difference between them lies in the type of proteins they have (those of amaranth grain or gelatin), and evidently this did not affect the stability of β -carotene exposed to different relative humidity during storage.

The water sorption isotherms for the SEF-BM and NS-BM samples showed the typical sigmoid form (type II isotherm), characteristic of starch-derived polymers, adjusting satisfactorily using the GAB model. The glass transition temperature (T_g) of the samples decreased with the increase in relative humidity due to the plasticizing effect of the water. It is important to note that in the range of 11 to 84% the samples were stored (at 25°C) above their T_g value. Therefore, the changes observed in the stored samples cannot be attributed to a drastic change in the mobility of the system produced by a state transition (from vitreous to gummy). It is concluded that the SEF matrix has a high potential as an encapsulating agent of hydrophobic compounds from the technological point of view due to the excellent physicochemical properties of the amylaceous matrix (high T_g , adequate surface of sorption), also exploiting the own amaranth proteins, thereby avoiding the extra addition of an emulsifier.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Universidad del Cauca and Universidad del Quindío.

REFERENCES

- [1] NIETO-CALVACHE, JHON; CUETO, MARIO; FARRONI, ABEL; DE ESCALADA-PLA, MARINA; GERSCHENSON, LÍA-NOEMI. Antioxidant characterization of new dietary fiber concentrates from papaya pulp and peel (*Carica papaya* L). Journal of Functional Foods, v. 27, 2016, p. 319-328.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.012>
- [2] VARGAS-MURGA, LILIANA; DE ROSSO, VERIDIANA; MERCADANTE, ADRIANA; OLMEDILLA-ALONSO, BEGOÑA. Fruits and vegetables in the Brazilian Household Budget Survey (2008–2009): carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. Journal of Food Composition and Analysis, v. 50, 2016, p. 88-96.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.012>
- [3] MÜLLER, LARS; CARIS-VEYRAT, CATHERINE; LOWE, GORDON; BÖHM, VOLKER. Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases a critical review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 56, n. 11, 2016, p. 1868-1879. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.801827>
- [4] JANISZEWSKA-TURAK, EMILIA. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. Food research international, v. 99, 2017, p. 891-901.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.001>
- [5] URSACHE, FLORENTINA-MIHAELA; ANDRONOIU, DOINA-GEORGETA; GHINEA, IOANA-OTILIA; BARBU, VASILICA; IONIȚĂ, ELENA; COTĂRLEȚ, MIHAELA; DUMITRASCU, LOREDANA; BOTEZ, ELISABETA; RÂPEANU, GABRIELA; STĂNCIUC, NICOLETA. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. Journal of Food Engineering, v. 219, 2018, p. 16-24.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.015>
- [6] GÓMEZ, C.A.; CASTRO, J.; RANGEL, E.; NAVARRO, R.O.; CABRERA, Z.E.; DÍAZ, L.; MARTÍNEZ, F.; GUZMÁN, F.A.; FALFAN, R.N. A modified Achira (*Canna indica* L.) starch as a wall material for the encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* extract using spray drying. Food Research International, v. 119, 2019, p. 547-553.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.031>
- [7] ZHU, FAN. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch-based systems. Food Chemistry, v. 229, 2017, p. 542-552.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.101>
- [8] AGUIAR, J.; ESTEVINHO, B.N.; SANTOS, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application - The specific case of coffee antioxidants. A review. Trends in Food Science and Technology, v. 58, 2016, p. 21-39.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.012>
- [9] XU, YAFENG; WANG, CHAN; FU, XIONG; HUANG, QIANG; ZHANG, BIN. Effect of pH and ionic strength on the emulsifying properties of two Octenylsuccinate starches in comparison with gum Arabic. Food Hydrocolloids, v. 76, 2018, p. 96-102.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.015>
- [10] TALÓN, EMMA; VARGAS, MARÍA; CHIRALT, AMPARO; GONZÁLEZ-MARTINEZ, CHELO. Eugenol incorporation into thermoprocessed starch films using different encapsulating materials. Food Packaging and Shelf Life, v. 21, 2019, p. 100326.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100326>
- [11] JIN, YANGYANG; LI, JASON; NIK, AMIR-MALAKI. Starch-based microencapsulation. Starch in Food, 2018, p. 661-690.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00017-2>

- [12] ROA, DIEGO; BUERA, PILAR; TOLABA, MARCELA; SANTAGAPITA, PATRICIO. Encapsulation and stabilization of β -carotene in amaranth matrices obtained by dry and wet assisted ball milling. *Food and Bioprocess Technology*, v. 10, 2017, p. 512-521.
<https://doi.org/10.1007/s11947-016-1830-y>
- [13] HOYOS-LEYVA, JAVIER D.; BELLO-PÉREZ, LUIS A.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; GARCIA, HUGO S. Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food reviews international*, v. 34, n. 2, 2018, p. 148-161.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1261298>
- [14] DE BARROS-FERNANDES, REGIANE-VICTÓRIA; COSTA-GUIMARÃES, ISABELA; RODRIGUES-FERREIRA, CHRISTIANE-LARA; ALVARENGA-BOTREL, DIEGO; VILELA-BORGES, SORAIA; DE SOUZA, AMANDA-UMBELINA. Microencapsulated Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil as a biopreservative in minas frescal cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 41, n. 1, 2019, p. 12759.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.12759>
- [15] GORDON, MANFRED; TAYLOR, JAMES S. Ideal copolymers and the 2nd order transitions of synthetic rubbers. Non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*, v. 2, n. 2, 1952, p. 493-500.
<https://doi.org/10.1002/jctb.5010020901>
- [16] LABUZA, T.P.; NALLY, L.; GALLAGHER, D.; HAWKES, J.; HURTADO, F. Stability of intermediate moisture foods. Lipid oxidation. *Journal of Food Science*, v. 37, n. 1, 1972, p. 154-159.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb03408.x>
- [17] GOLMAN, M.; HOREV, B.; SAM-SAGUY, I. Decolorization of β -Carotene in Model Systems Simulating Dehydrated Foods. *Mechanism and Kinetic Principles*, 1983, p. 52.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14890.x>
- [18] VAN DEN BERG, C.; BRUIN, S. Water activity and its estimation in food systems: Theoretical aspects. In: *Water Activity: Influence on Food Quality*. L. Rockland and G. Stewart. New York (USA): Academic Press, 1981, p. 1-61.
- [19] FURMANIAK, SYLWESTER; TERZYK, ARTUR P.; GOLEMBIEWSKI, ROMAN; GAUDEN, PIOTR A.; CZEPIRSKI, LESZEK. Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity. *Food Research International*, v. 42, n. 8, 2009, p. 1203-1214.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.004>
- [20] SPERLING, L.H. *Introduction to Physical Polymer Science*. New York (USA): John Wiley & Sons, 1986, p.46-48
- [21] JOUPPILA, K.; ROOS, Y. The physical state of amorphous corn starch and its impact on crystallization. *Carbohydrate Polymers*, v. 32, n. 2, 1997, p. 95.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00175-0)
- [22] ZHONG, ZHIKAI; SUN, SUSAN. Thermal characterization and phase behavior of cornstarch studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Engineering*, v. 69, n. 4, 2005, p. 453-459.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.07.023>
- [23] KATKOV, IGOR I.; LEVINE, FRED. Prediction of the glass transition temperature of water solutions: comparison of different models. *Cryobiology*, v. 49, n. 1, 2004, p. 62-67.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.05.004>
- [24] FONSECA-FLORIDO, HEIDI A.; GÓMEZ-ALDAPA, CARLOS A.; VELAZQUEZ, GONZALO; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, ERNESTO; MATA-PADILLA, JOSÉ M.; SOLÍS-ROSALES, SILVIA G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, GUADALUPE. Gelling of amaranth and achira starch blends in excess and limited water. *LWT-Food Science and Technology*, v. 81, 2017, p. 265-273.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.061>
- [25] OCHOA-VELASCO, C.E.; SALAZAR-GONZÁLEZ, C.; CID-ORTEGA, S.; GUERRERO-BELTRÁN, J.A. Antioxidant characteristics of extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces encapsulated with mesquite gum. *Journal of Food Science and Technology*, v. 54, n. 7, 2017, p. 1747-1756.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2564-1>

Germination in a venezuelan type of *Capsicum chinense* jacq.: influence of fruit ripening and seed extraction from the fruit*

Germinación de un tipo venezolano de *Capsicum chinense* jacq.: influencia de la maduración del fruto y de la extracción de la semilla desde el fruto

Germinação em tipo venezuelano de *Capsicum chinense* jacq.: influência do amadurecimento de frutas e extracção de sementes do fruto

GARRIDO, LUZ¹; LAURENTIN, HERNÁN²

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 22 de Marzo 2020.

Aprobado para publicación: 3 de Junio 2020.

* Proyecto de investigación de origen: "Estudios básicos sobre el ají dulce (*Capsicum* sp.) para la optimización de su producción hortícola". Financiación: Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Culminación: octubre de 2017.

- 1 Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Departamento de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía. Ingeniero Agrónomo. Barquisimeto, Venezuela. <https://orcid.org/0000-0003-1020-179X>.
- 2 Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Departamento de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía. Ph.D. en Ciencias Agrícolas. Barquisimeto, Venezuela. <https://orcid.org/0000-0001-6222-3566>

Correspondencia: hlaurentin@ucla.edu.ve

ABSTRACT

A type of sweet pepper of the species *Capsicum chinense* defines the Venezuelan cuisine, but this has not been enough to perform detailed studies of production issues in this crop. To determine the influence of fruit ripening, and seed extraction from the fruit on seed germination of a Venezuelan type of *Capsicum chinense*, a factorial experiment with 10 replications was conducted. Influence of the six combinations between three fruit maturation levels (green fruits, early-ripe fruits, and totally-ripe fruits) and two seed extraction moments of seed from the fruits (at the same day of the harvest and seven days after the harvest) were evaluated on seed germination percentage and days number to germination. Each replication consisted of 100 seeds, and seed germination was recorded for ten days. Results displayed no interaction between fruit ripening and extraction of seed for both dependent variables, but significant differences ($P < 0,01$) were recorded for germination percentage among fruit ripening levels (the same for totally yellow and fruits changing color, but higher than green fruits), and between separation moment of seed from the fruits (seven days after the harvest resulted in 80% more germination rate as compared to seed separated at the same day of the harvest). Significant differences ($P < 0,01$) were recorded also for the number of days to germination: seeds extracted from early- and totally-ripe fruits did not have significant differences ($P > 0,05$) and germinated in 7,30 days in average, but they germinated faster ($P < 0,01$) than seeds coming from green fruits which germinated in 8,40 days in average; seeds extracted from fruit 7 days after harvest germinated in 6,50 days in average, faster ($P < 0,01$) than seeds extracted from the fruit the same day of harvest (8,75 days in average). Seeds of this type of sweet pepper germinate more abundantly and faster when they are separated from ripening fruits seven days after harvest.

RESUMEN

El ají dulce de la especie *Capsicum chinense* caracteriza a la cocina venezolana por el sabor que dan sus frutos. Cabe destacar que en el cultivo hacen falta mas estudios relacionados con su producción. Para determinar el efecto de la madurez del fruto y el momento de extracción de la semilla del fruto sobre la germinación en un tipo de *C. chinense* venezolano, se llevó a cabo un experimento factorial con 10 repeticiones. Se evaluó el efecto de tres estados de madurez del fruto (frutos verdes, frutos en maduración temprana y frutos totalmente maduros) y dos momentos de extracción de la semilla del fruto (el mismo día de la cosecha y siete días después de la cosecha) sobre el porcentaje de germinación y el número de días a la germinación. Cada repetición consistió de 100 semillas, y la germinación fue registrada durante 10 días. Los resultados no mostraron interacción entre madurez del fruto y momento de extracción de la semilla sobre ambas variables dependientes, pero sí muestra-

KEYWORDS:

Sweet pepper; Fruit maturation; Number of days to germination; *Capsicum chinense* jacq.

PALABRAS CLAVE:

Ají dulce; Maduración del fruto; Número de días hasta la germinación; *Capsicum chinense* jacq.

PALAVRAS-CHAVE:

Piment doce, Maturação do fruto, Número de dias até a germinação, *Capsicum chinense* jacq

Cómo citar este artículo: Garrido, LUZ; Laurentin, Hernán. Germination in a Venezuelan type of *Capsicum chinense* jacq.: influence of fruit ripening and seed extraction from the fruit. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, v. 19, n. 1, 2021, p. 45-53. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)45-53](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)45-53)

ron diferencias ($P < 0,01$) para el porcentaje de germinación entre los niveles de madurez del fruto (igual para frutos en maduración temprana y totalmente maduros, pero más alto que para frutos verdes), y entre los dos momentos de extracción de la semilla del fruto (siete días después de la cosecha resultó en un 80% más de germinación con respecto a las semillas separadas el mismo día de la cosecha). Del mismo modo se encontraron diferencias para número de días a la germinación: semillas extraídas de frutos en maduración temprana y frutos totalmente maduros no mostraron diferencias ($P > 0,05$), y germinaron en 7,30 días en promedio, pero su germinación fue más rápida que la de las semillas obtenidas de frutos verdes las cuales germinaron en 8,40 días en promedio; las semillas separadas del fruto siete días después de la cosecha germinaron en 6,50 días en promedio, más rápido ($P < 0,01$) que las semillas separadas del fruto el mismo día de la cosecha (8,75 días en promedio). Las semillas de este tipo de ají dulce germinan de manera más abundante y más rápidamente cuando son separadas de frutos maduros siete días luego de cosecharlos.

RESUMO

Um tipo de pimenta doce da espécie *Capsicum chinense* define cozinha venezuelana, no entanto, isso não foi suficiente para realizar estudos detalhados de vários aspectos da produção nesta cultura. Para determinar a influência do amadurecimento e extração de sementes do fruto na germinação de um tipo venezuelano de *Capsicum chinense*, foi realizado um experimento fatorial com 10 repetições. Influência das seis combinações entre três níveis de maturação dos frutos (frutos verdes, frutos maduros e frutos totalmente maduros) e dois momentos de extração de sementes dos frutos (no mesmo dia da colheita e sete dias após a colheita) foram avaliados quanto à porcentagem de germinação das sementes e número de dias até a germinação. Cada replicação consistiu em 100 sementes e a germinação das sementes foi registrada durante dez dias. Os resultados não mostraram interação entre amadurecimento e extração de sementes para ambas as variáveis dependentes, mas foram registradas diferenças significativas ($P < 0,01$) para a porcentagem de germinação entre os níveis de amadurecimento dos frutos (o mesmo para o amarelo e a mudança de cor dos frutos, mas superior ao verde frutos) e entre o momento da separação das sementes dos frutos (sete dias após a colheita resultou em 80% mais taxa de germinação em comparação com as sementes separadas no mesmo dia da colheita). Diferenças significativas ($P < 0,01$) foram registradas também para o número de dias para a germinação: as sementes extraídas de frutos maduros e totalmente maduros não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) e germinaram em 7,30 dias em média, mas germinaram mais rapidamente ($P < 0,01$) do que sementes provenientes de frutos verdes que germinaram em 8,40 dias em média; as sementes extraídas dos frutos 7 dias após a colheita germinaram em 6,50 dias em média, mais rápido ($P < 0,01$) do que as sementes extraídas dos frutos no mesmo dia da colheita (8,75 dias em média). As sementes deste tipo de pimenta doce germinar mais abundantemente e mais rapidamente quando separados de frutas maduras sete dias após a colheita deles.

INTRODUCTION

Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) is a species belonging to the plant family Solanaceae, which comprises herbaceous and perennial plants. This species domesticated in Amazonas basin [1], is grown and consumed in many parts of the world. It is worldwide recognized for the fruit pungency, especially by cultivar "Habanero", however, *C. chinense* has a large genetic diversity [2], mainly in South America, including many non-pungent types. For these authors, Venezuelan accessions present a high genetic variability, therefore this country is considered as diversity center of the crop. Venezuelan cuisine is characterized by the flavor given by fruits of *C. chinense* [3], which belong to the non-pungent types. It is named "sweet pepper" in this country to differentiate it of the pungent types "chilli pepper". It is used for sauce and stew elaboration for meats and fishes. Despite of the great importance of this kind of "sweet pepper" in Venezuela, there is a little knowledge about the crop. Some studies about horticultural management have been carried out, such as transplant time [4], pruning [5], disease control [6], irrigation [7], however, there is a little knowledge about seed in this species [8], and there is no previous studies about seed germination in this Venezuelan type of *C. chinense* except the carried out for evaluating priming with potassium nitrate [9].

Knowledge of the conditions required for maximum germination is an important key fact to optimize plantlets production. Farmers complain about low and uneven germination for *C. chinense* [9], observation indicated not only for

this species, but also for the five domesticated species of *Capsicum* genus [10]. High, fast, and uniform germination is desirable for planning production, therefore is necessary to get information for optimizing germination process. Seed germination in *Capsicum* genus is influenced by dormancy [11], and seed development [12], among others factors. Seed pre-conditioning, and priming are some of the strategies used for increasing germination in *Capsicum* genus [10, 13, 14, 15], however, for *C. chinense* is not known if seed development, as consequence of moment of fruit harvest and moment of seed extraction of the fruit, could be the cause of poor germination. These aspects are necessary to know them in order to be more precise to design strategies to optimize germination in "sweet pepper" *C. chinense*.

The objective of this research was to determine the influence of fruit ripening, and seed extraction from the fruit, on germination percentage and number of days to germination of one variety of the Venezuelan type of *C. chinense* called "sweet pepper".

METHOD

Plant material

Thirty plantlets of "sweet pepper" of *C. chinense* species, belonging to the cultivar "Rosita" were obtained from a recognized nursery in Quibor, Lara state, Venezuela. These plantlets were transplanted individually in bags containing 3000 cm³ of substrate (sand and clay soil 1:1). They were irrigated twice a week until fruits used for the experiment were obtained.

Seeds extraction

Each plant was considered suitable to get fruits for the experiment after 3 fruits were totally developed at the plant, which occurred around the day 45 since the transplant date. Fruits for each plant were harvested in the following way: two just when on the green fruit appeared the first light green line (these fruits were called green fruits), two when half of the fruit was yellow and the other half remained green (these fruits were called early-ripe fruits), and the last two ones just when fruits became totally yellow (these fruits were called totally-ripe fruits). At the end, sixty green fruits, sixty early-ripe fruits, and sixty totally ripe fruits had been harvested. For each of the three fruit categories, half of the fruits were opened and seeds were taken (these seeds were called seeds extracted at day 1), and half of the fruits remained at room temperature (about 28°C) and were opened 7 days after harvest to obtain the seed (these seed were called seeds extracted at day 7). Fruit harvest and seed extraction were synchronized to start germination tests for all the treatments at the same day, it means, a day named day 0 were harvested 30 green fruits, 30 early-ripe fruits, and 30 totally ripe fruits, for all these fruits seeds were kept inside of the fruits. At the day named day 8 were harvested 30 green fruits, 30 early-ripe fruits, and 30 totally ripe fruits, and seeds were extracted from these fruits; furthermore seeds were collected from fruits harvested at the day 0.

Experiment design

A completely random experiment design with six treatments and ten replication was established in Agua Viva (512 meter on sea level, average temperature of 26°C, average relative humidity of 75%), Palavecino Municipality, Lara state, Venezuela. The treatment design was a factorial 3x2, where main factors were Maturation of the Fruit and Extraction Moment of the Seed, the first one with three levels (green fruits, early-ripe fruits, and totally ripe fruits), and the second one with two levels (seeds separated at day 1, and seeds separated at day 7). Experimental units were germination chambers (anime trays 20 x 12 cm as support of paper towel, covered with transparent plastic cover 10 cm height), one per replication, containing 100 seeds recorded for germination.

Germination tests

One hundred seeds for each experimental unit were used for germination tests. Seeds were placed in germination chambers at room temperature (about 27°C in average). Germination was recorded for each experimental unit during 10 days, so close to the period used by Hernandez *et al.* (2019) [16] for evaluating germination in *C. chinense*. Germination percentage for each day, and over the ten days, was calculated. Seeds were considered germinated when the radicle emerged. Number of days to germination, was calculated as a weighted average according the amount of seeds germinated at each day.

Data analysis

Variance analysis were performed for germination each day and over all the days, and also for number of days to germination; considering the main factors and their interaction. Variables resulting in statistical differences were subjected to Tukey mean test. All the statistical analyses were performed with Statistix for Windows v. 8.0.

RESULTS

Evaluation of seed germination in six combinations between three fruit maturation stages and two moments of seed extraction from the fruits resulted in data showed in Figure 1. Germination started at day 3 for seeds coming from totally-ripe fruits and separated at day 7. Interaction for Maturation of the Fruit and Separation Moment of the Seed did not show significant differences ($P>0,05$) neither for Germination Percentage (for each day or over all the days) nor for Number of Days to Germination. Germination percentage for fourth, fifth, sixth, and seventh day of evaluation showed differences ($P<0,01$) only for Moment of Seed Separation: germination for seeds separated of the fruit at day 7 was in average 10-fold higher ($P<0,01$) than germination percentage of seeds separated of the fruits at day 1 (Figure 2). Germination percentage accumulated on the ten days of evaluation displayed statistical differences ($P<0,01$) for both main factors (Figure 3); totally- and early-ripe fruits had germination over 60% while green fruits did not reach 50%. Seeds separated 7 days after fruits harvest had more than 80% of germination, while seeds separated the same day of the fruits harvest reached only 34% of germination. Number

Figure 1. Germination percentage for six treatments in a Venezuelan type of "sweet pepper" *C. chinense* during 10 days (GF is green fruits, ERF is Early Ripe Fruits, TRF is Totally Ripe Fruits, SE1 is Seed Extracted from the Fruit at Day 1, SE7 is Seeds Extracted from the Fruit at Day 7).

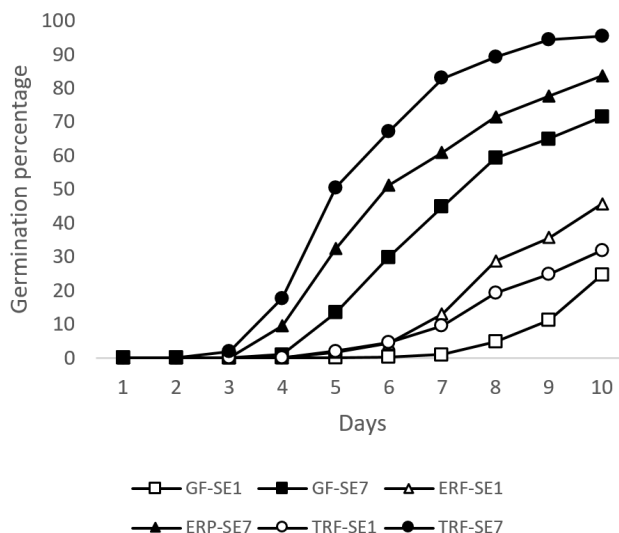


Figure 2. Germination percentage for seeds separated of the fruit at the harvest day, and 7 days after harvest, at fourth, fifth, sixth, and seventh day of germination evaluation. Means represented with different letters showed statistical differences ($P < 0,01$).

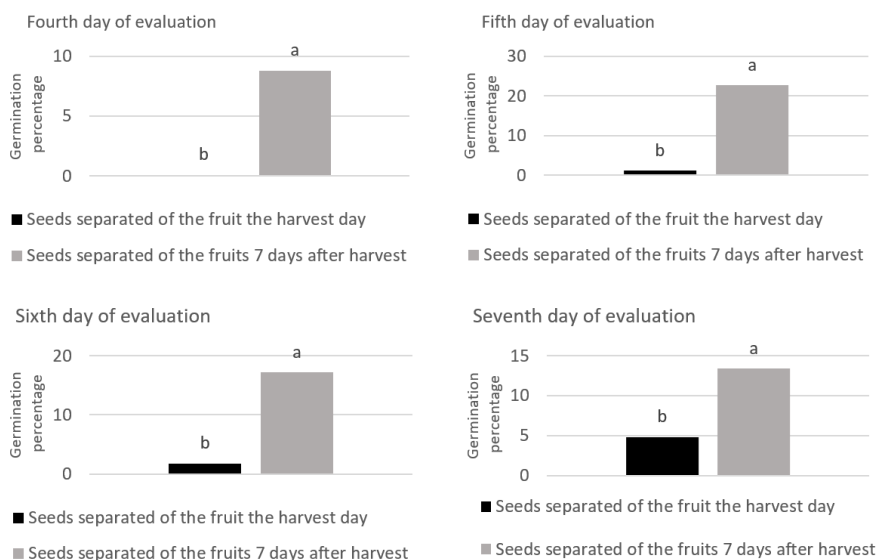
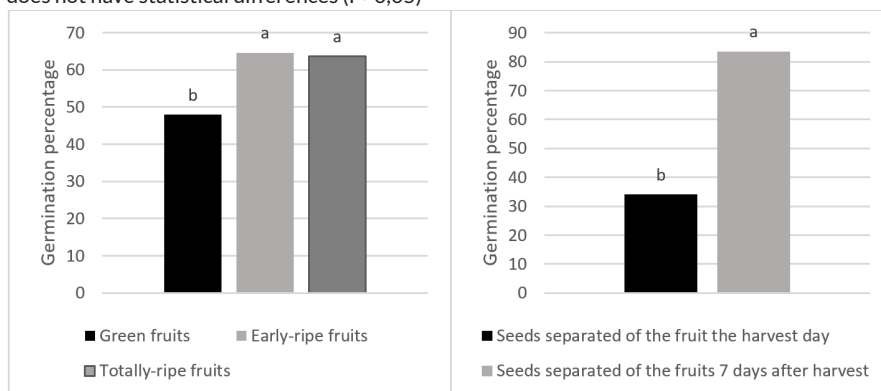


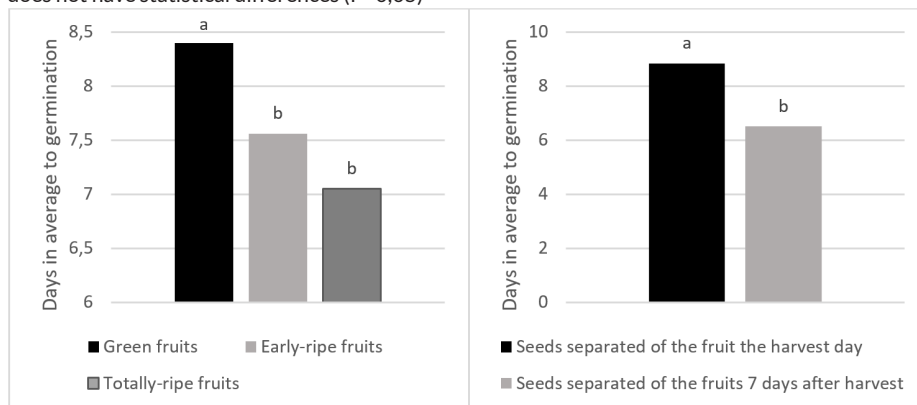
Figure 3. Germination percentage after ten days of evaluation, for three maturation stages of the fruit, and two moments of seed separation of the fruits. Means represented by the same letter does not have statistical differences ($P > 0,05$).



of days to germination resulted also with differences ($P < 0,01$) for the main factors evaluated (Figure 4). While seeds obtained from green fruit germinated in $8,40 \pm 1,49$ days, seeds obtained from early-ripe fruits germinated in $7,56 \pm 1,48$ days, and from totally-ripe fruits in $7,05 \pm 1,66$ days. More evident for number of days to germination is the effect of moment of seed separation of the fruits: $6,50 \pm 1,28$ days for seeds separated from the fruits at day 7 after harvest, and $8,75 \pm 0,94$ for seeds separated from the fruit the same day of the harvest.

Production of high quality seeds depends, among several factors, on appropriate harvest time [17]. Results of the present work indicate that percentage of seed germination and number of days to germination in *C. chinense* is affected by ripening of the fruits, and moment of seed separation from the fruit. Complain of farmers about uneven germination and low germination percentage [9, 10] could be caused by lack of uniformity in ripening level of fruits harvested to get seeds, and/or lack of uniformity in moment of seed separation from the fruits. Most of the attempts to overcome the problem of low germination percentage in *C. chinense* and other species of the

Figure 4. Days in average to germination after ten days of evaluation, for three maturation stages of the fruit, and two moments of seed separation of the fruits. Means represented by the same letter does not have statistical differences ($P>0,05$)



genus *Capsicum* have been based in use of adequate substrates [18], priming strategies [9, 10, 12], or studies about optimal seed storage [19], however, there is no reports about systematic comparison among germination percentages and number of days to germination of seeds coming from different ripening fruits levels or different moment of seed separation from the fruits. According to results of this research, green fruits should not be harvested to get seeds due to the low germination percentage and higher number of days to germination. Low germination percentage in immature fruits of *C. chinense* is due to the absence of some reserve substances in the seeds caused by insufficient physiological maturity [20]. To harvest early-ripe fruits, or totally-ripe fruits has the same effect on germination percentage and number of days to germination, increasing germination percentage in about 15% as compared to seeds coming from green fruits; and accelerating the time to obtain germination in about 1 day (from 8,4 days in green fruits to 7,3 days in early- and totally-ripe fruits). Maximum germination of seeds in the period of 71-81 days after anthesis was found in pepper (*Capsicum baccatum*) seeds [17]; this result differs as compared to results of present work, where maximum germination occurred with early-ripe fruits, and this fruit state occurred about day 55 after anthesis.

Fruits and therefore seeds of these species are consumed by birds, and digestive tract acts on seed to become them suitable for germination [21]. It is possible that, if seeds are kept inside the fruits as in the present research, they are subjected to the action of some fruit metabolites which appear after fruit is harvested, it means, when decomposition of the fruit starts, giving the opportunity to become the seed ready to germinate, in a similar way as bird digestive tract acts on the seeds of *C. chinense*. This theory could explain the fact that seeds separated from the fruit 7 days after harvest had higher germination percentage and faster germination speed than seed which did not have the chance to be subjected to the action of the fruit metabolites. Exogenous capsaicin application (0,1 ppm) to seeds of *C. annuum* increased germination percentage and shortened germination time [22], and, considering that the type of Venezuelan "sweet pepper" evaluated in the present work belongs to the genus *Capsicum*, it could be possible that minimal levels of capsaicin are produced in the fruit and affect percentage and speed of germination. Capsaicinoids levels and maximum amount produced depends, among other factors, on *C. chinense* cultivar or accessions, and they increases according to ripening of the fruit [23]. Water stress increases levels of capsaicinoids in *C. chinense*, [24] and it occurs when fruits are separated from the plant, therefore, it is a possible explanation about faster germination and higher germination percentage in the present work.

CONCLUSIONS

There is not statistical interaction between ripening fruits levels and moment of seed separation from the fruits when germination percentage and number of days to germination were evaluated in *Capsicum chinense* culti-

var Rosita, however, there are effect of these factors individually. Seeds extracted from green fruits had lower germination percentage (48%) and lower germination speed (8,40 days) than seeds coming from early- (65% of germination, 7,56 days to germination) and totally-ripe fruits (64% of germination, 7,05 days to germination). Seeds separated from the fruit 7 days after harvest had higher germination percentage (83% and 6,50 days) and faster germination speed than seeds separated of the fruits the same day of the harvest (34% and 8,75 days).

ACKNOWLEDGMENT

Authors wish to express gratitude to Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico of Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado, for support the Project 029-AG-2014 from which this paper was obtained.

REFERENCES

- [1] YUMI-BABA, VIVIANE; ROCHA, KATIA-REAL; GOMES, GISELY-PAULA; RUAS, CLAUDETE-DE FÁTIMA; RUAS, PAULO-MAURÍCIO; RODRIGUEZ, ROSANA; AZEREDO-GONÇALVES, LEANDRO-SIMÕES. Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on morphological characterization and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 63, n. 8, 2016, p. 1371-1381.
<https://doi.org/10.1007/s10722-015-0325-4>
- [2] PALADINI-MOREIRA, ALINE-FABIANA; RUAS, PAULO-MAURÍCIO; DE FÁTIMA-RUAS, CLAUDETE; YUMI-BABA, VIVIANE; GIORDANI, WILLIAN; MENDONÇA-ARRUDA, ISABELLA; RODEIGUEZ, ROSANA; AZEREDO-GONÇALVES, LEANDRO-SIMÕES. Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. *Scientia Horticulturae*, v. 236, 2018, p. 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.012>
- [3] PASTRAN, FÉLIX. Desarrollo cultural canario-venezolano desde la expresión humana, religiosa, deportiva, gastronómica y agrícola. *Revista Chakiñan de Ciencias Sociales y Humanidades*, v. 7, 2019, p. 118-134.
- [4] MONTAÑO, M.; NELSON, J. Efecto de la edad de trasplante sobre el rendimiento de tres selecciones de ají dulce (*Capsicum chinense* Jacq.). *Bioagro*, v. 12, 2000, p. 55-59.
- [5] JAIMEZ, RAMÓN E.; NAVA, N.; RIVERO, Y.; TROMPIZ, K. Efecto de diferentes intensidades de poda sobre la dinámica de floración y producción de ají dulce (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, v. 19, 2002, p. 132-139.
- [6] CEDEÑO, LUÍS; CARRERO, CHRYSTIAN; JAIMEZ, RAMÓN. Pudrición basal del ají dulce por *Haematonecrotia haematococca* en el estado Mérida, Venezuela. *Interciencia*, v. 28, 2003, p. 590-592
- [7] GIL-MARÍN, JOSÉ A.; MONTAÑO-MATA, NELSON; PLAZA, RAMIRO. Efecto del riego y la cobertura del suelo sobre la productividad de dos cultivares de ají dulce. *Bioagro*, v. 24, 2012, p. 143-148.
- [8] AYALA-GARAY, O.J.; PINZÓN-LÓPEZ, L.L.; LATOURNERIE-MORENO, L.; AYALA-GARAY, A.V.; TOVAR-CARVAJEL, S. Adaptaciones metodológicas para evaluar la calidad fisiológica en semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agroproductividad*, v. 11, n. 9, 2018, p. 9-14.
<https://doi.org/10.32854/agrop.v11i9.1208>
- [9] ANDRADE, SOELIS; LAURENTIN, HERNÁN. Efecto del nitrato de potasio sobre la germinación de semillas de tres cultivares de ají dulce (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología*, v. 33, 2015, p. 25-29.
- [10] MAVI, KAZIM. Evaluation of organic priming to improve the emergence performance of domesticated *Capsicum* species. *Seed Science and Technology*, v. 46, 2018, p. 131-137.
<https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.1.13>
- [11] CANO-VASQUEZ, ANAID; LÓPEZ-PERALTA, MARÍA-CRISTINA; ZAVALA-MANCERA, HILDA; CRUZ-HUERTA, NICACIO; RAMÍREZ-RAMÍREZ, IVÁN; GARDEA-BÉJAR, ALFONSO; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, VÍCTOR. Variación en grados de latencia en semillas entre colectas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Botanical Sciences*, v. 93, 2015, p. 1-10.
<http://dx.doi.org/10.17129/botsci.138>

- [12] EKEN, NAZLI-IIKE; MAVI, KAZIM. Determination of relationships between fruit maturity stages and seed development and quality in aji pepper (*C. baccatum* var. *pendulum*). *Tarım Bilimleri Dergisi*, v. 22, 2016, p. 69-76.
- [13] HERNANDEZ-LOPEZ, ALEJANDRO; BELTRÁN-PEÑA, ELDA-GUADALUPE; AMANCIO-OLIVEIRA, ANTONIA-ELENIR; NUÑEZ-GAONA, ÓSCAR; AVILA-ALEJANDRE, ALMA-XOCHIL. Preacondicionamiento del agua en la germinación y emergencia de *Capsicum chinense* Jacq. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, v. 9, n. 8, 2018, p. 1703-1714.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.1030>
- [14] SANDOVAL-RANGEL, ALBERTO; TAPIA-GONZÁLEZ, ALEJANDRA; CABRERA-DE LA FUENTE, MARCELINO; GONZÁLES-FUENTES, JOSÉ-ANTONIO; BENAVIDES-MENDOZA, ADALBERTO. Age, benefit and gibberellic acid affect the germination and production of piquin pepper plant. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, v. 20, 2018, p. 4199-42019.
<http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v0i20.990>
- [15] SOSA-PECH, MARINO; RUIZ, ESAU; TUN-SUÁREZ, JOSÉ-MARÍA; PINZÓN, LUÍS. Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. Inoculadas con *Bacillus* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, v. 6, n. 16, 2019, p. 137-143.
<http://dx.doi.org/10.19136/era.a6n16.1801>
- [16] HERNÁNDEZ-LÓPEZ, ALEJANDRO; AVILA-ALEJANDRE, ALMA-XOCHIL; MENDOZA-FRANCISCO, NOE; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, HÉCTOR. Design, construction, verification and testing of a low cost germinator. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, v. 10, n. 2, 2019, p. 431-440.
<http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v10i2.871>
- [17] CANTUÁRIA-FIGUEIREDO, JOSIANE; SANTOS-DE SOUZA, DAVID-ANDRÉIA; DA SILVA, CLEISSON-DENER; RIBEIRO-AMARO, HUGO-TIAGO; DAVID-ALVES, DORISMAR. Maturacao de sementes de pimenta em funcao de épocas de colheita dos frutos. *Scientia Agraria*, v. 18, n. 3, 2017, p. 1-7
- [18] DAVID-SANTOYA, JESSE-JOEL-EDSON; GÓMEZ-ÁLVAREZ, REGINO; JARQUÍN-SÁNCHEZ, AARÓN; VILLANUEVA-LÓPEZ, GILBERTO. Caracterización de vermicompostas y su efecto en la germinación y crecimiento de *Capsicum chinense* Jacquin. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, v. 5, n. 14, 2018, p. 181-190.
<http://dx.doi.org/10.19136/era.a5n14.1465>
- [19] KUMAR-VERMA, VEERENDRA; KUMAR-JHA, ANJANI; PATEL, RAMKISHOR; NGACHAN, S.V. Studies on storage life and effect of temperature and pre-sowing seed treatments on germination behaviour and maturity indices in King-chilli (*Capsicum* spp.). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, v. 88, n. 8, 2018, p. 1162-1167.
- [20] MOO-MUÑOZ, A.J.; AYALA-GARAY, O.J.; LATOURNERIE-MORENO, L.; TZEC-MAY, Y.A.; PINZÓN-LÓPEZ, L.L. Efecto de la madurez y secado de semilla de *Capsicum chinense* Jacq. en la germinación y calidad fisiológica de plántula. *Agroproductividad*, v. 9, n. 1, 2016, p. 63-67.
- [21] MORTENSEN, JONATHAN M.; MORTENSEN, JOEL E. The power of capsaicin. *Journal of Continuing Education*, v. 11, n. 1, 2009, p. 8-12.
- [22] ARIN, LEVENT; ARABACI, ÇAGATAY. The influence of exogenous capsaicin application on the germination, seedling growth, and yield of pepper. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, v. 43, 2019, p. 1-8.
10.3906/tar-1903-86
- [23] OLGUIN-ROJAS, JOSÉ-ARTURO; FAYOS, ORETO; VÁSQUEZ-LEÓN, LUCIO-ABEL; FERREIRO-GONZÁLEZ, MARTA; RODRÍGUEZ-JIMENES, GUADALUPE-DEL CAMEN; PALMA, MIGUEL; GARCÉS-CLAVER, ANA; BARBERO, GERARDO-F. Progression of the total and individual capsaicinoids content in the fruits of three different cultivars of *Capsicum chinense* Jacq. *Agronomy*, v. 9, n. 3, 2019, p. 141-155.
10.3390/agronomy9030141
- [24] JEEATID, N.; TECHAWONGSTEIN, S.; SURIHARN, B.; CHANTHAI, S.; BOSLAND, P.W.; TECHAWONGSTEIN, S. Influence of water stresses on capsaicinoid production in hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars with different pungency levels. *Food Chemistry*, v. 245, 2018, p. 792-797.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.110>

Adsorption of chrome (VI) and mercury (II) in solution using hyacinth (*Eichhornia crassipes*)*

Adsorción de cromo (VI) y mercurio (II) en solución utilizando jacinto (*Eichhornia crassipes*)

Adsorção de cromo (VI) e mercúrio (II) em solução utilizando hiácito (*Eichhornia crassipes*)

TEJADA-TOVAR, CANDELARIA¹; PAZ, ISABEL²; ACEVEDO-CORREA, DIOFANOR³;
ESPINOSA-FORTICH, MARÍA⁴; LÓPEZ-BADEL, CRISTINA⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 29 de Enero 2020.

Aprobado para publicación: 5 de Junio 2020.

* Título del proyecto de origen: "Aprovechamiento integral del buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) como material adsorbente de metales pesados y para la obtención de carboximetilcelulosa". Financiación: Universidad de Cartagena. Culminación: 2016.

1 University of Cartagena, Research Group IDAB. M.Sc. in Environmental Engineering. Cartagena, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2323-1544>

2 University of Tolima, Research Group CEDAGRITOL. Ph. D in Engineering. Ibagué, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0935-8856>

3 University of Cartagena, Research Group IDAA. Ph. D in Food Engineering. Cartagena, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-1364-7044>

4 University of Cartagena, Research Group IDAB. Bachelor of Chemical Engineering. Cartagena, Colombia

Correspondencia: dacevedoc1@unicartagena.edu.co

ABSTRACT

The existence of water hyacinth proliferation in wetlands of the Canal del Dique (Bolívar- Colombia) causes environmental problems because there is no final disposal of these. Therefore, it is necessary to study alternatives for its use. The objective of the study was to evaluate the behavior of the aquatic hyacinth as an adsorbent of Cr (VI) (VI) and Hg (II) (II) in a synthetically prepared solution. The lignocellulosic material was dried at 80°C for 24 h to remove moisture; then crushed and sieved with meshes of different particle sizes; characterized by elemental analysis to check for the presence of cellulose, hemicellulose, and lignin, as well as by Fourier Transform Infrared Spectrometry to verify the existence of functional groups responsible for the adsorption process. It was found that the best particle size was 1 mm, with a removal percentage of 73,4 and 79,3% for Cr (VI) and Hg (II), respectively. When establishing the adsorption kinetics, it was verified that the elimination percentage increases with time up to 5,5 h of contact with the Hg (II) solution and 3,8 h with the Cr (VI) solution.

RESUMEN

La existencia de proliferación de Jacinto acuático en los humedales del Canal del Dique (Bolívar-Colombia) causa problemas ambientales por no existir una disposición final de estos. Por lo tanto, es necesario estudiar alternativas para su uso. El objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento del Jacinto acuático como adsorbente de cromo (VI) y mercurio (II) en una solución preparada sintéticamente. El material lignocelulósico se secó a 80°C durante 24 h para eliminar la humedad; luego se trituró y tamizó con mallas de diferentes tamaños de partículas; se caracterizó mediante análisis elementales para comprobar la presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina, así como mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier para verificar la existencia de grupos funcionales responsables del proceso de adsorción. Se encontró que el mejor tamaño de partícula era de 1 mm, con un porcentaje de remoción de 73,4 y 79,3% para el cromo y el mercurio, respectivamente. Al establecer la cinética de adsorción se comprobó que el porcentaje de eliminación aumenta con el tiempo hasta 5,5 h de contacto con la solución de mercurio y 3,8 h con la solución de cromo.

RESUMO

A existência de proliferação de jacintos de água nas zonas húmidas do Canal del Dique (Bolívar-Colombia) causa problemas ambientais porque não há disposição final dos mesmos. Portanto, é necessário estudar alternativas para o seu uso. O objetivo do estudo foi avaliar o comportamento do jacinto aquático como adsorvente de cromo (VI) e mercúrio (II) em uma solução sinteticamente

KEYWORDS:

Residual Biomass; Adsorption; Heavy Metals; Freundlich model; *Eichhornia crassipes*.

PALABRAS CLAVE:

Biomasa residual; Adsorción; Metales pesados; Modelo de Freundlich; *Eichhornia crassipes*.

PALAVRAS-CHAVE:

Biomassa residual; Adsorção; Metais pesados; Modelo de Freundlich; *Eichhornia crassipes*.

Cómo citar este artículo: TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; PAZ, ISABEL; ACEVEDO-CORREA, DIOFANOR; ESPINOSA-FORTICH, MARÍA; LÓPEZ-BADEL, CRISTINA. Adsorption of chrome (VI) and mercury (II) in solution using hyacinth (*Eichhornia crassipes*). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 54-65. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)54-65](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)54-65)

preparada. O material lignocelulósico foi seco a 80°C durante 24 h para remover a humidade; depois triturado e peneirado com malhas de diferentes tamanhos de partículas; caracterizado pela análise elemental para verificar a presença de celulose, hemicelulose e lignina, bem como pela Espectrometria de Infravermelhos por Transformada de Fourier para verificar a existência de grupos funcionais responsáveis pelo processo de adsorção. Verificou-se que o melhor tamanho de partícula era de 1 mm, com uma percentagem de remoção de 73,4 e 79,3% para o crómio e o mercúrio, respectivamente. Ao estabelecer a cinética de adsorção verificou-se que a percentagem de eliminação aumenta com o tempo até 5,5 h de contacto com a solução de mercúrio e 3,8 h com a solução de crómio.

INTRODUCTION

The increase of nutrients in water bodies due to poor environmental practices in agricultural and industrial activities causes eutrophication, which affects the socio-economic and ecological development of aquatic systems because of invasive plant species [1, 2]. This generates a decrease in dissolved oxygen, as well as the difficulty for the circulation of watercraft, fishing and the limited availability of water for treatment. Among the most invasive plants are the water fern (*Azolla filiculoides*), the Elodea (*Egeria densa*), and the water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), among others [1-3].

On the other hand, the presence of heavy metals in bodies of water implies risks for human public health, given their non-biodegradation and high toxicity [4, 5]. The most common metals present in water are: Cadmium, Cobalt, Copper, Manganese, Hg (II), Nickel, Lead and Zinc; which are produced in activities such as agriculture, metallurgy, energy production, microelectronics, mining, sewage sludge and waste disposal [6, 7]. These pollutants can affect aquatic systems through runoff, leaching and transport through mobile colloids; once released they dissolve to form ions or complexes, and their accumulation decreases water quality and alters the food chain as a consequence of the death of the species [8-10]. Several methods have been developed for the removal of heavy metals in solution among which stand out: chemical precipitation, chemical coagulation, oxidation, reduction, ion exchange, filtration, ultrafiltration, nanofiltration, adsorption (activated carbon, zeolites, silica gel), membrane technologies (reverse osmosis), electrochemical treatment (electrodialysis and electrocoagulation) and application of artificial wetlands (stabilization ponds), among others, which are costly for operating and installation costs [11, 12]. Biosorption is a physicochemical process that allows the retention of dissolved ions by plant materials that trap metal ions by attracting opposite charges, thanks to their lignocellulosic nature [7, 13].

In this context, adsorbents of vegetable residual origin have been used for water cleaning, among them: tea, coffee waste, watermelon seed husks, ceiba fiber, palm bagasse, yam and yucca husks, peat, fly ash, cellulose, fungi immobilized in nanosilica, orange peels, Kikuyo, among others [14-16]. Cu, Al, As, Hg (II), Fe, Ni, Ca and Pb, have been removed using bioadsorbents from water buffon, finding that this biomass of lignocellulosic origin has good percentages and removal capacities of metal ions as well as of phenolic compounds, due to its lignocellulosic nature and the presence of hydroxyl and carboxyl groups that benefits the removal [17, 18]. Therefore, in the present study the water hyacinth is used in the removal of Hg (II) and Cr (VI) from a synthetic aqueous solution in a batch system.

METHOD

Adaptation of lignocellulosic material

The experiments were carried out in the Environmental Laboratory at the Faculty of Engineering of the Universidad de Cartagena. Water hyacinth samples were used in the best possible state, from the Canal del Dique, Department of Bolívar (Colombia). Longitude 75.505553 and Latitude 10.402918, at room temperature (30°C), 1 atm, 2 m above sea level and a relative humidity of approximately 80%. Initially, the leaves and stems harvested with distilled water were washed to remove soluble compounds adhered to it and impurities, which can interve-

ne in the adsorption. Subsequently, they were dried in an oven at 80°C for 24 h and reduced in size in a knife mill for 20 min. Finally, it was classified into a sieve to obtain sizes of 0,355, 0,5 and 1 mm [19].

Characterization of the bioadsorbent material

The bioadsorbent material was characterized in order to identify the content of cellulose, hemicellulose by the TAPPI method T 203 os-74, which is a method for the determination of α -, β -, and γ -cellulose. For this, the pulp is extracted consecutively with 17,5 and 9,45% sodium hydroxide solutions at 25°C. The soluble fraction, consisting of beta and gamma-celluloses, is determined volumetrically by oxidation with potassium dichromate, and alpha-cellulose, as an insoluble fraction, is obtained by difference. In general, alpha-cellulose indicates a cellulose content of non-degraded molecular weight in the pulp; beta-cellulose indicates that a degraded cellulose, and gamma-cellulose is composed mainly of hemicellulose.

The lignin content was determined by the TAPPI method T 222 om-83, for this the carbohydrates of the biomass are hydrolyzed and solubilized with sulfuric acid; the insoluble acid lignin is separated by filtration, dried and weighed.

The functional groups responsible for the adsorption were also identified by FTIR analysis (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) [20, 21].

Adsorption tests

To perform the adsorption tests, a Shaking incubator IN-666 was used, which previously contained an Erlenmeyer with 0,5 g of biomass and solutions of Hg (II) and Cr (VI) at 100ppm with a pH of 6 and 2, which were prepared by adding 0,1 g of Merck brand HgCl_2 and 0,1 g of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ to 1 L of deionized water, respectively. We worked with 100 mL of the solution with a concentration of 100 ppm and 0,5 g of biomass of each particle size of the biomass already crushed (0,355 mm, 0,5 mm and 1 mm) placing them in a Beaker with stirring for 2 hours at 150 rpm, extracting samples of 3 mL at the end of the agitation. The analysis of the final concentration of the metal in the liquid phase is carried out by the method of diphenylcarbazide and ammonium diocyanate at 584 and 281 nm, for Cr (VI) and Hg (II) respectively, in a UV-vis spectrophotometer [5,18]. The experiments were carried out in duplicate.

Kinetics and adsorption isotherms

With the best particle size selected, a test was performed to establish the kinetics. 0.5 g of the biomass was weighed and the experimental assembly was made for the adsorption; both samples (main and replica) were kept in the shaker for 7, 5 hours, at 150 rpm and 25°C.

To determine the equilibrium time of adsorption, the kinetics were carried out taking aliquot of 3 mL every 30 minutes, performing independent experiments, so as not to affect the concentration of the metals in the solution. The adsorption isotherms were applied to analyze the metal adsorption equilibrium data in the evaluated adsorbent, for the realization of the assays initial concentrations of 25, 50, 75 and 100 ppm were used [5,22]. All the tests were carried out in triplicate, taking the arithmetic average of the data, the consistency of the data was verified by calculating the standard deviation and the analysis of the data was made using OriginPro 8®.

RESULTS

Characterization of the lignocellulosic material

The results presented in Table 1 allowed corroborating the content of lignocellulosic material is high. The main components of the lignocellulosic materials contain a variety of functional groups that play an essential role in metal sorption. This feature is due to the ion exchange between positive cations and sodium, potassium, cal-

cium, and magnesium present in the adsorbent. Being this mechanism next to the chelation, the main mechanisms that cause the sorption of metals in lignocellulosic sorbents [8,23,24]. The chemical composition of some common lignocellulosic materials studied in the processes of metal sorption are composed of cellulose (30-35%), hemicellulose (20-40%), lignin (15-25%), small amounts of water, ash, and cyclic hydrocarbons. Percentages of components depending on the type and part of the plant, the leaves contain a lower percentage of cellulose (15-25%), and lignin (5-10%). However, they have a higher percentage of hemicellulose (70-80%), while in stones and nuts, the lignin content is higher than cellulose and hemicellulose (30-40%) [13, 15, 25, 26].

Table 1. Results of the chemical analysis of the water hyacinth.

Sample	Stek	Sheet
Cellulose	26,94 ± 0,62	24,71 ± 0,72
Hemicellulose	27,82 ± 0,54	20,42 ± 0,87
Lignin	6,18 ± 0,32	12,91 ± 0,49

Evaluation of the effect of particle size

The particle size selection was carried out. The best particle size was 1 mm since was obtained the highest percentage of removal and adsorption capacity of both metals (Table 2). Therefore it was chosen to perform all the tests. The selection was based on choosing that particle size where there would be a lower absorbance, indicating the lower concentration of the metal in the solution after being in contact with the biomass; this, in turn, indicates a higher percentage of removal [7, 27, 28].

Table 2. Adsorption data of each particle size selected for Hg (II) and Cr (VI) tests.*

Particle size (mm)	Hg (II)		Cr (VI)	
	% removal	q _t (mg/g)	% removal	q _t (mg/g)
0,355	65,59	13.318	59,88	11.976
0,50	71,96	14.392	72,20	14.44
1,00	79,28	15.856	73,41	14.68

* The data presented in the table are averaged.

In the size selection for adsorption, it would be expected that at a smaller particle size, there would be an increase in surface area and thereby a greater adsorption of the metal would be evidenced. However, the results obtained for the water hyacinth show that adsorption was favored for the larger particle size. It is important to note that the metals are located in the active sites of the biomass, which causes the pores to close as they capture the pollutant; these pores are made of lignocellulosic material, which degrades as it begins. To decrease the particle size, the active sites are destroyed and, therefore, adsorption does not occur, or at least in the expected degree [17, 29, 30].

This effect can be appreciated from the characterization carried out by FTIR analysis on the biomass after the contact with hyacinth, comparing it with that made to the biomass before adsorption. The peaks around 1733,70 cm⁻¹ in the biomass spectrum are produced by the stretching of the C=O carbonyl group which indicates the vibration of the carboxyl groups of pectin, hemicellulose and lignin in the biomass studied. The stretching of C=C, possibly as a result of the presence of benzene or aromatic rings in lignin, can be seen in the peaks 1615,60 cm⁻¹ and 1684,04cm⁻¹. The presence of aliphatic groups can also be observed at 1558,97 cm⁻¹. (CH), aromatic groups, the vibrations of methyl, methylene and methoxy groups, while in the intense band comprised between 1238,28 cm⁻¹ to 602,49 cm⁻¹, the presence of alcohols and carboxylic acids is evidenced [15, 31]. When comparing the before and after the adsorption process, most of these peaks show an increase in the intensity and width of the bands due

to a variation in the frequency of adsorption. It could be attributed to the union of the ions Cr^{+6} with the different groups present in the biosorbent, as evidenced by the change of the adsorption peak to $2927,87 \text{ cm}^{-1}$.

After Hg adsorption, greater peak intensity was observed around the $3000\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ band, corresponding to the hydroxyl groups and the bandwidth of $2361,93 \text{ cm}^{-1}$ to CH vibration. Finally, the peaks of this range $1238,28 \text{ cm}^{-1}$ to $602,49 \text{ cm}^{-1}$, which represent the groups of alcohols and carboxylic acids, are no longer shown after adsorption. It was concluded that the groups involved in the elimination of metals in this research are hydroxyl, carboxylic and aliphatic groups [9,32, 33]. These results confirm the information found in the literature for the characterization.

Statistical analysis

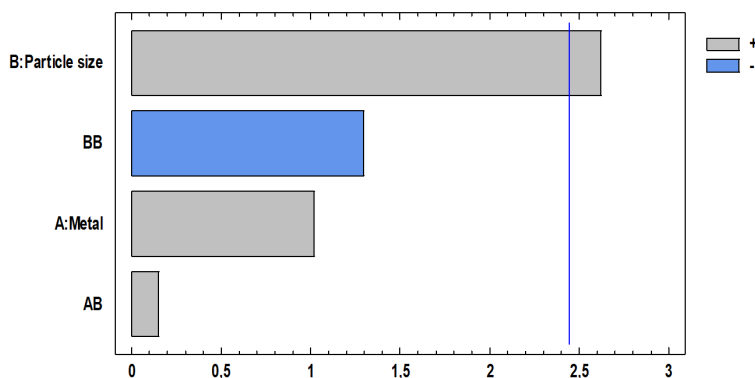
The results obtained from the analysis of variance (ANOVA), carried out to establish the statistical significance of the effect of the metal and the particle size, comparing its mean square with an estimate of the experimental error can be shown in Table 3. Thus, the values of the significant parameters in the process of adsorption of Cr (VI) and Hg (II) over water voids were obtained, and a 95% confidence level was established.

Table 3. Analysis of variance for the adsorption capacity of Cr (VI) and Hg (II) on hyacinth.

Font	Sum of squares	Gl	Half square	F- value	P Value
A:Metal	2,06622	1	2,06622	1,03	0,3491
B:Particle size	13,7516	1	13,7516	6,86	0,0396
AB	0,0431556	1	0,0431556	0,02	0,8881
BB	3,36831	1	3,36831	1,68	0,2424
bloques	0,970102	1	0,970102	0,48	0,5126
Error total	12,024	6	2,004		
Total (corr.)	29,3795	11			

Independently of the metal evaluated, the particle size of the adsorbent is the variable with the greatest positive influence on the process (Figure 1), establishing a standard error of 1,42. On the other hand, since the P-value is more significant than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residues with a significance level of 5,0% [34, 35].

Figure 1. Pareto chart for Cr (VI) and Hg (II) removal capacity.



Kinetics and adsorption isotherms

Once the optimum particle size was established to perform the adsorption tests, the adsorption kinetics for each metal was established. For this, absorbance data were taken at different times of contact with the hyacinth. It was observed that as time passes, the percentage of removal of Hg (II) and Cr (VI) increases gradually (Figure 2), indicating the accumulation of metals in the available active sites until they are saturated. Once this happens, a maximum percentage of removal was obtained, and in the future a constant behavior will be observed. The percentage of removal is greater for the case of Hg (II) adsorption; taking as an example adsorption at 100 min, where the percentage of removal of Cr (VI) is 65% and that of Hg (II) is approximately 82% [34-36].

The data obtained from the adsorption tests were fitted to the Pseudo-First Order (PFO) [6], Pseudo-Second Order (PSO) [9] and Elovich [11] kinetic models. Figure 1 shows the fit to the above mentioned Cr (VI) and Hg (II) waterbottle models.

From the adjustment of the obtained data and the correlation coefficient (R^2) (Table 4), it was established that the Pseudo- Second Order model describes the behavior of the adsorption process. Therefore, it was establi-

Figure 2. Fitting of adsorption kinetics models of Hg (II) and Cr (VI) on water hyacinth.

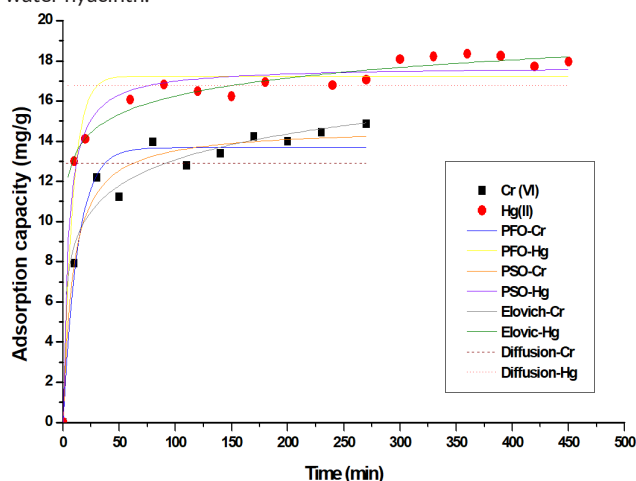


Table 4. Adjustment parameters for Cr (VI) and Hg (II) deadsorption kinetic models on water bucket.

Model	Parameters	Metal	
		Cr(VI)	Hg(II)
Pseudo-First order	q_e (mmol/g)	13,6839	17,2437
	k_1 (min ⁻¹)	0,0769	0,1194
	R^2	0,9503	0,9586
Pseudo-Second order	q_e (mmol/g)	14,691	17,726
	k_2 (g ⁻¹ min ⁻¹)	0,0078	0,0129
	R^2	0,9748	0,9812
Elovich		0,5388	0,7689
		21,2832	3461,69
	R^2	0,9699	0,9901
Intraparticle diffusion	K	12,9012	16,7988
	R^2	0,7961	0,8884

shed that Cr (VI) can be adsorbed by two active sites in the biomass and that the process occurs by chemisorption due to the formation of chemical bonds between adsorbent and adsorbate at the surface [30].

The Elovich model presents a good fit of the adsorption data of both metals, so it can be said that the process also takes place inside the particle pores of bioadsorbent materials and that their active sites are heterogeneous. Thus, exhibiting different activation energies throughout the adsorption process [36]. Furthermore, this suggests that the rate-limiting passage of this adsorption system can be controlled by chemisorption involving valence forces through the sharing or exchange of electrons between sorbent and sorbate [23, 31, 34].

To establish the adsorption isotherms for each metal, absorbance data were taken at different concentrations for the solutions in contact with the biomass, with which the adsorption isotherms were constructed according to the Langmuir and Freundlich models to compare them with the behavior obtained [37, 38]. For each model, their respective constants were found according to the adsorption of each metal, specifically, as reported in Table 5.

The constants allowed the construction of the adsorption isotherms for Cr (VI) and Hg (II) according to each model (Figures 3 and 4).

The isotherm that best describes the experimental behavior related to the type of adsorption is the Freundlich model (Figures 3 and 4). This model was chosen according to the highest R^2 found using the OriginPro®, which allows to

Table 5. Constants of the Langmuir and Freundlich models.

Isotherm model	Parameters	Cr (VI)	Hg (II)
Langmuir	$q_{\max}$	217,710	8,58
	B	$3,60 \times 10^{-1}$	$2,942 \times 10^{-3}$
	SS	5,985	1,92
Freundlich	Kf	$5,99 \times 10^{-4}$	0,73
	1/n	2,205	0,49
	SS	0,396	1,29

Figure 3. Adsorption isotherms of Langmuir and Freundlich for the adsorption of Hg (II).

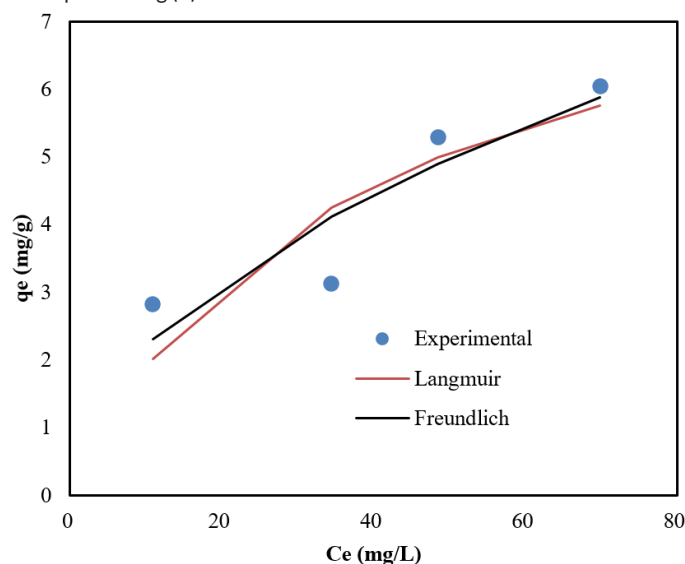
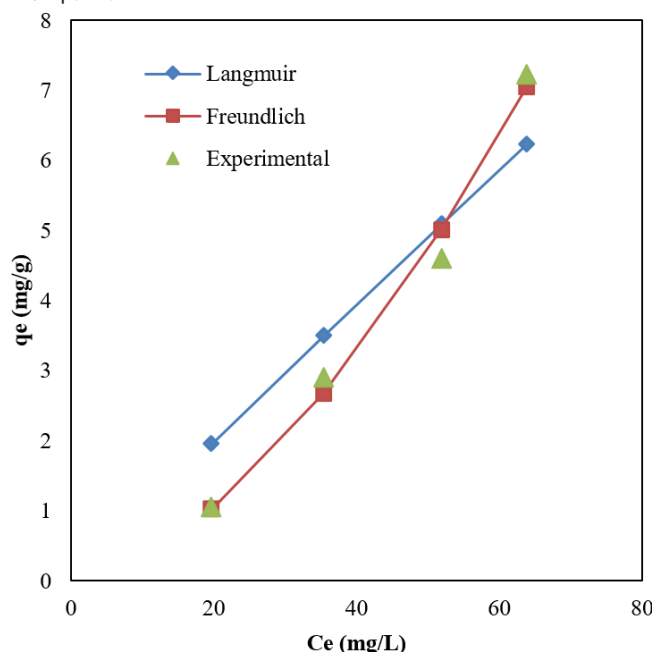


Figure 4. Langmuir and Freundlich Adsorption Isotherms for Cr (VI) Adsorption.



affirm that the adsorption of Cr (VI) and Hg (II) in the water hyacinth occurs in a microporous surface, where unlike the model of Langmuir does not assume the formation of a monolayer, but is applied in multiple layers of adsorption.

For this reason, it is said that there is an energetically heterogeneous distribution of the available active sites for the adsorption of the metal [39-42]. On the other hand, the value of Freundlich's constant n is in the range 1-10 for Hg (II). This indicates that the adsorption process is favorable [11], [12]

CONCLUSION

The best particle size for adsorption corresponds to 1 mm, obtaining a 79.2% removal of Hg (II) and 73.4% of the Cr (VI) present in the solution. By establishing the adsorption kinetics, it was found that the percentage of adsorption increases with time until the active sites available for adsorption are saturated. The saturation of the biomass occurred after being in contact with the solution 5,5 h for Hg (II) and at 3,8 h for Cr (VI). According to the analysis of the adsorption isotherms, the Freundlich adsorption model was the best at fitting the data. The water hyacinth is a good material to remove metal contaminants such as Cr (VI) and Hg (II), present in aqueous solutions.

REFERENCES

- [1] YU, HAIHAO; DONG, XIANRU; YU, DAN; LIU, CHUNHUA; FAN, SHUFENG. Effects of eutrophication and different water levels on overwintering of *Eichhornia crassipes* at the northern margin of its distribution in China. *Frontiers in plant science*, v. 10, 2019, p. 1-11.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01261>
- [2] TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; PAZ-ASTUDILLO, ISABEL; VILLABONA-ORTÍZ, ÁNGEL; ESPINOSA-FORTICH, MARÍA; LÓPEZ-BADEL, CRISTINA Aprovechamiento del Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*) para la síntesis de carboximetilcelulosa. *Revista Cubana de Química*, v. 30, n. 2, 2018, p. 211-221.

- [3] ZHANG, QIAN; LUO, FANG-LI; DONG, BI-CHENG. Does species richness affect the growth and water quality of submerged macrophyte assemblages?. *Aquatic botany*, v. 153, 2019, p. 51-57.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.11.006>
- [4] MARIMÓN-BOLÍVAR, WILFREDO; TEJEDA-BENÍTEZ, LESLY; HERRERA, ADRIANA-P. Removal of Hg (II) (II) from water using magnetic nanoparticles coated with amino organic ligands and yam peel biomass. *Environmental nanotechnology, monitoring & management*, v. 10, 2018, p. 486-493.
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.10.001>
- [5] TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; VILLABONA-ORTÍZ, ÁNGEL; GONZÁLEZ-DELGADO, ÁNGEL-DARÍO; JIMÉNEZ-VILLADIEGO, MARÍA. Kinetics of Hg (II) and nickel adsorption using chemically pretreated cocoa (*Theobroma cacao*) husks. *Transactions of the ASABE*, v. 62, n. 2, 2019, p. 461-466.
- [6] VILLABONA-ORTIZ, ÁNGEL; TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; GONZÁLEZ-DELGADO, ÁNGEL; HERRERA-BARROS, ADRIANA; CANTILLO-ARROYO, GINA. Immobilization of lead and nickel ions from polluted yam peels biomass using cement-based solidification/stabilization technique. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2019, 2019, p. 8.
<https://doi.org/10.1155/2019/5413960>
- [7] DAI, YINGJIE; SUN, QIYA; WANG, WENSI; LU, LU; LIU, MEI; LI, JINGJING; YANG, SHENGSHU; SUNG, YUE; ZHANG, KEXIN; XU, JIAYI; ZHENG, WENLEI; HU, ZHAOYUE; YANG, YAHAN; GAO, YUEWEN; CHEN, YANJUN; ZHANG, ZU; GAO, FENG; ZHANG, YING. Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review. *Chemosphere*, v. 211, 2018, p. 235-253.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.179>
- [8] GÓMEZ-AGUILAR, DORA-LUZ; RODRÍGUEZ-MIRANDA, JUAN-PABLO; ESTEBAN-MUÑOZ, JAVIER-ANDRÉS; BETANCUR, JHON-FREDY. Coffee Pulp: A sustainable alternative removal of Cr (VI) in wastewaters. *Processes*, v. 7, n. 7, 2019, p. 403.
<https://doi.org/10.3390/pr7070403>
- [9] MANJULADEVI, M.; ANITHA, R.; MANONMANI, S. Kinetic study on adsorption of Cr (VI), Ni (II), Cd (II) and Pb (II) ions from aqueous solutions using activated carbon prepared from *Cucumis melo* peel. *Applied water science*, v. 8, n. 1, 2018, p. 36.
<https://doi.org/10.1007/s13201-018-0674-1>
- [10] ASUQUO, EDIDIONG; MARTIN, ALASTAIR; NZEREM, PETRUS; SIPERSTEIN, FLOR; FAN, XIAOLEI. Adsorption of Cd (II) and Pb (II) ions from aqueous solutions using mesoporous activated carbon adsorbent: Equilibrium, kinetics and characterisation studies. *Journal of environmental chemical engineering*, v. 5, n. 1, 2017, p. 679-698.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.043>
- [11] UL-HAQ, ATTA; SAEED, MUHAMMAD; ANJUM, SALMA; HUSSAIN-BOKHARI, TANVEER; USMAN, MUHAMMED; TUBBSUM, SAIQA. Evaluation of Sorption Mechanism of Pb (II) and Ni (II) onto Pea (*Pisum sativum*) Peels. *Journal of oleo science*, v. 66, n. 7, 2017, p. 735-743.
<https://doi.org/10.5650/jos.ess17020>
- [12] VILLABONA-ORTÍZ, A.; TEJADA-TOVAR, C.N.; ORTEGA-TORO, R. Modelling of the adsorption kinetics of Cr (VI) (VI) using waste biomaterials. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 19, n. 1, 2020, p. 401-408.
<https://doi.org/10.24275/rmiq/IA650>
- [13] AFROZE, SHARMEEN; SEN, TUSHAR-KANTI. A review on heavy metal ions and dye adsorption from water by agricultural solid waste adsorbents. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 229, n. 7, 2018, p. 225.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-3869-z>
- [14] PARLAYICI, ŞERIFE; PEHLIVAN, EROL. Comparative study of Cr (VI) removal by bio-waste adsorbents: equilibrium, kinetics, and thermodynamic. *Journal of Analytical Science and Technology*, v. 10, n. 1, 2019, p.15.
<https://doi.org/10.1186/s40543-019-0175-3>
- [15] ROMERO-CANO, LUIS A.; GARCÍA-ROSETO, HELENA; GONZALEZ-GUTIERREZ, LINDA V.; BALDENE-GRO-PÉREZ, LEONARDO A.; CARRASCO-MARÍN, FRANCISCO. Functionalized adsorbents prepared from fruit peels: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies for copper adsorption in aqueous solution. *Journal of cleaner production*, v. 162, 2017, p. 195-204. Ç
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.032>

- [16] NEGM, NABEL A.; ABD-EL-WAHED, MOHAMED; HASSAM, ABDEL-RAHMAN; ABOU-KANA, MARAM. Feasibility of metal adsorption using brown algae and fungi: Effect of biosorbents structure on adsorption isotherm and kinetics. *Journal of Molecular Liquids*, v. 264, 2018, p. 292-305.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.027>
- [17] BATAGARAWA, SAMAILA-MUAZU; AJIBOLA, ALAYANDE-KEHINDE. Comparative evaluation for the adsorption of toxic heavy metals on to millet, corn and rice husks as adsorbents. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 3, 2019, p. 119-125.
<https://doi.org/10.15406/japlr.2019.08.00325>
- [18] TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; HERRERA-BARROS, ADRIANA; VILLABONA-ORTÍZ, ANGEL. Assessment of chemically modified lignocellulose waste for the adsorption of Cr (VI). *Revista Facultad de Ingeniería*, v. 29, n. 54, 2020, p. e10298-e10298.
<https://doi.org/10.19053/01211129.v29.n54.2020.10298>
- [19] HERRERA-BARROS, ADRIANA; TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; VILLABONA-ORTÍZ, ÁNGEL; GONZÁLEZ-DELGADO, ÁNGEL; REYES-RAMOS, ANA. Synthesis and characterization of cassava, yam and lemon peels modified with TiO₂ nanoparticles. *Contemporary Engineering Sciences*, v. 11, n. 38, 2018, p. 1863-1871.
<https://doi.org/10.12988/ces.2018.84186>
- [20] TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; VILLABONA-ORTÍZ, ANGEL; RUIZ-PATERNINA, ERIKA. Adsorción de Ni (II) por cáscaras de ñame (*Dioscorea rotundata*) y bagazo de palma (*Elaeis guineensis*) pretratadas. *Revista Luna Azul*, v. 42, 2016, p. 30-43.
- [21] TEJADA-TOVAR, CANDELARIA; GALLO-MERCADO, JORGE; MOSCOTE, JEISON; VILLABONA, ÁNGEL; ACEVEDO-CORREA, DIOFANOR. Adsorción competitiva de plomo y níquel sobre cáscara de ñame y bagazo de palma en sistema continuo. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 16, n. 1, 2018, p. 52-61.
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.624>
- [22] TEJADA, CANDELARIA; HERRERA, ADRIANA; RUIZ, ERIKA. Kinetic and isotherms of biosorption of Hg (II) using citric acid treated residual materials. *Ingeniería y competitividad*, v. 18, n. 1, 2016, p. 117-127.
- [23] SINGH, KULBIR; ABDULLAHI, WAZIRI-SADIQ; RAM, CHHOTU. Removal of hmetals by Adsorption using agricultural based residue: A Review. *Research Journal of Chemistry and Environment*, v. 22, n. 5, 2018, p. 65-74.
- [24] RODRIGUEZ-SOTO, K.X.; PIÑEROS-CASTRO, N.Y.; ORTEGA-TORO, R. Laminated composites reinforced with chemically modified sheets-stalk of Musa cavendish. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 18, n. 2, 2019, p. 749-758.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n2/RodriguezS>
- [25] ABDOLALI, ATEFEH; NGO, HUU-HAO; GUO, WENSHAN; ZHOU, JOHN L.; ZHANG, SHUANG; CHANG, SOON W.; NGUYEN, DINH-DUC; LUI, YI. Application of a breakthrough biosorbent for removing heavy metals from synthetic and real wastewaters in a lab-scale continuous fixed-bed column. *Bioresource technology*, v. 229, 2017, p. 78-87.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.016>
- [26] KHALIFA, E. BEN; RZIG, B.; CHAKROUN, R.; NOUAGUI, H.; HAMROUNI, B. Application of response surface methodology for Cr (VI) removal by adsorption on low-cost biosorbent. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 189, 2019, p. 18-26.
<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.03.014>
- [27] Yi, YUNHONG; LV, JUNLIANG; LIU, YI; WU, GONGQING. Synthesis and application of modified Litchi peel for removal of hexavalent Cr (VI) from aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*, v. 225, 2017, p. 28-33.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.10.140>
- [28] NAIK, RADNEY-MOHAN; RATAN, S.; SINGH, I. Use of orange peel as an adsorbent for the removal of Cr (VI) from its aqueous solution. *Indian Journal of Chemical Technology*, v. 25, n. 3, 2018, p. 300-305.
- [29] ROSALES, A.G.; RODRÍGUEZ, C.D.; BALLEEN-SEGURA, M. Remoción de contaminantes y crecimiento del alga *Scenedesmus sp.* en aguas residuales de curtiembres, comparación entre células libres e inmovilizadas. *Ingeniería y Ciencia*, v. 14, n. 28, 2018, p. 11-34.
<https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.28.1>
- [30] DOKE, KAILAS; KHAN, EJAZUDDIN. Equilibrium, kinetic and diffusion mechanism of Cr (VI) adsorption onto activated carbon derived from wood apple shell. *Arabian journal of chemistry*, v. 10, n. 1, 2017, p. S252-S260.

- <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.031>
- [31] ASUQUO, EDIDIONG; MARTIN, ALASTAIR. Sorption of cadmium (II) ion from aqueous solution onto sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) peel adsorbent: characterisation, kinetic and isotherm studies. *Journal of environmental chemical engineering*, v. 4, n. 4, 2016, p. 4207-4228.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.09.024>
- [32] KUPPUSAMY, SARANYA; THAVAMANI, PALANISAMI; MEGHARAJ, MALLAVARAPU; VENKATESWARLU, KADIYALA; LEE, YONG-BOK; NAIDU, RAVI. Oak (*Quercus robur*) acorn peel as a low-cost adsorbent for hexavalent Cr (VI) removal from aquatic ecosystems and industrial effluents. *Water, Air & Soil Pollution*, v. 227, n. 2, 2016, p. 62.
<https://doi.org/10.1007/s11270-016-2760-z>
- [33] LIANG, XIAOLIANG; WEI, GAOLING; XIONG, JUAN; TAN, FUDING; HE, HONGPING; QU, CHENCHEN; YIN, HUI; ZHU, JIANXI; ZHU, RUNLIANG; QIN, ZONGHUA; ZHANG, JING. Adsorption isotherm, mechanism, and geometry of Pb (II) on magnetites substituted with transition metals. *Chemical Geology*, v. 470, 2017, p. 132-140.
<https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.09.003>
- [34] ALI, ASHRAF; SAEED, KHALID; MABOOD, FAZAL. Removal of Cr (VI) (VI) from aqueous medium using chemically modified banana peels as efficient low-cost adsorbent. *Alexandria Engineering Journal*, v. 55, n. 3, 2016, p. 2933-2942.
<https://doi.org/10.1016/j.aej.2016.05.011>
- [35] GARBA, ZAHARADDEEN; UGBAGA, NKOLE; ABDULLAHI, AMINA. Evaluation of optimum adsorption conditions for Ni (II) and Cd (II) removal from aqueous solution by modified plantain peels (MPP). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 5, n. 2, 2016, p. 170-179.
<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.03.001>
- [36] HU, XIAOLAN; XUE, YINGWEN; LIU, LINA; ZENG, YIFAN; LONG, LI. Preparation and characterization of Na₂S-modified biochar for nickel removal. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 10, 2018, p. 9887-9895.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1298-6>
- [37] SHEN, ZHENGTAO; ZHANG, YUNHUI; MCMILLAN, OLIVER; JIN, FEI; AL-TABBAA, ABIR. Characteristics and mechanisms of nickel adsorption on biochars produced from wheat straw pellets and rice husk. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 14, 2017, p. 12809-12819.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-8847-2>
- [38] SUDHA, R.; PREMKUMAR, P.; RAMASAMY, S. Comparative studies on the removal of Cr (VI) (VI) from aqueous solutions using raw and modified citrus limettioides peel. *Indian Journal of Chemical Technology (IJCT)*, v. 25, n. 3, 2018, p. 255-265.
- [39] LIN, CHAO; LUO, WENJUN; LUO, TIANIAN; ZHOU, QI; LI, HAIFENG; JING, LURU. A study on adsorption of Cr (VI) by modified rice straw: Characteristics, performances and mechanism. *Journal of cleaner production*, v. 196, 2018, p. 626-634.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.279>
- [40] KAR, SHANTI; EQUENUDDIN, S.M. Adsorption of hexavalent Cr (VI) using natural goethite: isotherm, thermodynamic and kinetic study. *Journal of the Geological Society of India*, v. 93, n. 3, 2019, p. 285-292.
<https://doi.org/10.1007/s12594-019-1175-z>
- [41] ALLAHDIN, OSCAR; MABINGUI, JOSEPH; WARTEL, MICHEL; BOUGHRIET, ABDEL. Removal of Pb²⁺ ions from aqueous solutions by fixed-BED column using a modified brick: (micro) structural, electrokinetic and mechanistic aspects. *Applied Clay Science*, v. 148, 2017, p. 56-67.
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.08.002>
- [42] LEE, CHANG-GU; LEE, SOONJAE; PARK, JEONG-ANN; PARK, CHANHYUK; LEE, SANG-JEONG; KIM, SONG-BAE; AN, BYUNGRYUL; YUN, SEONG-TAEK; LEE, SANG-HYUP; CHOI, JAE-WOO. Removal of copper, nickel and Cr (VI) mixtures from metal plating wastewater by adsorption with modified carbon foam. *Chemosphere*, v. 166, 2017, p. 203-211.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.093>

Prevalencia de cinco virus de ARN en tubérculos-semilla de papa cultivados en Antioquia (Colombia)*

Prevalence of five RNA viruses in potato seed-tubers grown in Antioquia (Colombia)

Prevalência de cinco vírus de ARN em tubérculos-semente de batata cultivados em Antioquia (Colombia)

GALLO-GARCÍA, YULIANA¹; SIERRA-MEJIA, ANDREA ²; GUTIÉRREZ,
PABLO-ANDRÉS³; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 20 de Febrero 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Título de los proyecto de origen: "Caracterización genómica de virus de RNA que infectan *Solanum tuberosum* en Antioquia utilizando secuenciación de nueva generación (NGS)". Financiación: Dirección de Investigación e Innovación - Universidad CES. Culminación: 28 de Agosto de 2019. Caracterización molecular del viroma de plantas solanáceas de importancia económica en Antioquia. Financiación: Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL). Culminación: 1 de Marzo de 2019.

1 Universidad CES, Facultad de Medicina, Grupo de investigación de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias. PhD en Biotecnología. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6018-453X>

2 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de Biotecnología Microbiana. Ingeniera Biológica. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0893-5882>

3 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de Biotecnología Microbiana: PhD en Bioquímica. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7003-6485>

4 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de Biotecnología Vegetal. PhD en Fitopatología. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7123-2747>

Correspondencia: ygallo@ces.edu.co

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los productos agrícolas con mayor demanda interna en Colombia. Este cultivo es afectado por un complejo de virus que reduce los rendimientos y la calidad de los tubérculos-semilla. En este trabajo se evaluó la prevalencia de cinco virus de ARN (PVY, PVS, PVX, PLRV y PVV) en brotes de tubérculos-semilla de origen comercial (TC) y no-comercial (TNC) y en sus plantas derivadas, utilizando RT-PCR en tiempo real. Los resultados evidenciaron altos niveles de infección de los cinco virus en el material de siembra e infecciones mixtas hasta con cuatro virus en los tubérculos comerciales. PVY (74%) y PVS (36%) presentaron los mayores niveles de prevalencia en plantas derivadas de tubérculos-semilla. La combinación PVY+PLRV presentó el mayor nivel de prevalencia en tubérculos-semilla TC (24%), mientras que en TNC las combinaciones PVY+PVV+PVS y PVY+PVS+PLRV se presentaron en 10% de las muestras. La afinidad filogenética de los virus detectados se evaluó mediante secuenciación Sanger de amplicones de cápside, agrupándose en subclados previamente identificados sobre solanáceas en Colombia. Estos resultados señalan la necesidad de tomar acciones urgentes que permitan mejorar los niveles de sanidad viral de los materiales de siembra de papa cultivados en el país.

ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the agricultural products with highest internal demand in Colombia. However, this crop is affected by a virus complex that have a dramatic effect in yields and on the quality of tuber-seeds. In this work we tested the prevalence of five RNA viruses (PVY, PVS, PVX, PLRV and PVV) in tuber-seed sprouts and their corresponding plantlets using real-time RT-PCR. Tuber-seeds were obtained from commercial (TC) and informal seed (TNC) distributors. Our results suggest high levels of infection with all five viruses in seed potatoes. Mixed infections, with up to four different viruses, were found with high frequency in certified or registered seed tubers. PVY (74%) and PVS (36%) were the most prevalent viruses using leaf tissues. The combination PVY+PLRV (24%) was the most common mixed infection in commercial tuber-seeds. In non-commercial seeds the most prevalent mixed infections were PVY+PVV+PVS and PVY+PVS+PLRV at 10%. The phylogenetic affinity of all viruses under study was determined by partial sequencing of their CP genes, which confirmed their close relationship with previously characterized Colombian strains. These results underscore the urgent need to improve the health status in potato seed-tubers used by farmers in Colombia.

PALABRAS CLAVES:

RT-qPCR; Secuenciación; Solanaceae; Virología vegetal; Virus de la papa.

KEYWORDS:

RT-qPCR; Sequencing; Solanaceae; Plant virology; Potato viruses.

PALAVRAS-CHAVE:

RT-qPCR; Sequenciamento; Solanaceae; Vírus da batata; Virologia vegetal.

Cómo citar este artículo: Gallo-García, Yuliana; Sierra-Mejía, Andrea; Gutiérrez, Pablo-Andrés; Marín-Montoya, Mauricio. Prevalencia de cinco virus de ARN en tubérculos-semilla de papa cultivados en Antioquia (Colombia). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 66-78. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)66-78](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)66-78)

RESUMO

A batata (*Solanum tuberosum*) é um dos produtos agrícolas com maior demanda interna na Colômbia. Este cultivo é afetado por um complexo de vírus que reduzem os rendimentos e a qualidade dos tubérculos-semente. Neste trabalho foi avaliada a prevalência de cinco vírus de ARN (PVY, PVS, PVX, PLRV y PYVV) em brotos de tubérculos-semente de origem comercial (TC) e não comercial (TNC) e em plantas derivadas desses brotos, usando RT-PCR em tempo real. Os resultados evidenciaram altos níveis de infecção dos cinco vírus no material de semeadura e infecções mistas com até quatro vírus nos tubérculos comerciais. PVY (74%) e PVS (36%) apresentaram os maiores níveis de prevalência em plantas derivadas de tubérculos-semente. A combinação PVY+PLRV apresentou o maior nível de prevalência em tubérculos-semente TC (24%), enquanto em TNC as combinações PVY+PYVV+PVS e PVY+PVS+PLRV foram detectadas em 10% das amostras. A afinidade filogenética dos vírus detectados foi avaliada por sequenciamento Sanger de amplicons da cápside, agrupando-se em subclados previamente identificados sobre solanáceas na Colômbia. Estes resultados indicam a necessidade de tomar ações urgentes para melhorar os níveis de sanidade viral dos materiais de semeadura de batata no país.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los más importantes en el mundo. Para el año 2018, en Colombia se reportó un área de siembra de papa de 132.161 ha con un rendimiento promedio de 20,8 t/ha [1], que al compararse con el Reino Unido (país que cuenta con un área similar de siembra), corresponde a tan sólo un 48% de la producción alcanzada en dicho país. Estas diferencias resultan de múltiples aspectos agronómicos, agroambientales y socioeconómicos; pero sin duda, un factor diferenciador es el uso de semilla certificada, que para países desarrollados supera el 90%, mientras que, en economías emergentes como Colombia, tan solo se reporta su uso en niveles de entre 0,5 y 10% [2]. Uno de los objetivos principales de los programas de certificación de semilla es limitar la incidencia de patógenos (ej. bacterias, hongos, virus y viroides) en niveles inferiores al umbral de daño económico. Sin embargo, en cultivos como la papa que se propagan en forma vegetativa a través de tubérculos, la situación es compleja, dado el proceso de degeneración de la semilla a lo largo de ciclos sucesivos de propagación asexual [3]. El uso masivo de tubérculos-semilla certificados ha representado para los países de Europa occidental y América del norte el aumento en los rendimientos de este cultivo en niveles del 70 al 100% [2]. En el caso de Colombia, el uso de semilla certificada para el año 2015 alcanzó sólo el 5% a nivel nacional y su producción está concentrada en unas pocas variedades. La mayor parte de los agricultores de papa desconocen las ventajas técnicas y económicas de la adopción de la semilla certificada y su alto costo en comparación con la semilla tradicional es un factor que limita su acceso a pequeños productores. Sin embargo, la cadena productiva de la papa se ha planteado como uno de los objetivos para el futuro próximo, alcanzar un índice de uso de semilla certificada del 20% en todo el país [4].

Entre los principales agentes causales de la degeneración del tubérculo-semilla de papa se destacan los nematodos (ej. *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp.), bacterias (ej. *Ralstonia solanacearum* y *Streptomyces scabies*), hongos y oomicetes (ej. *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*), polillas (ej. *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella*) y diferentes virus, siendo reportados para este último caso, alrededor de 40 especies en el mundo. En la actualidad, los virus que presentan mayor importancia económica para el cultivo de la papa incluyen: potato leafroll virus (PLRV), potato virus A (PVA), potato virus S (PVS), potato virus X (PVX) y potato virus Y (PVY) [5]. En Colombia se han registrado como los virus de mayor importancia: PVY, PVS, PVX, PLRV, potato yellow vein virus (PYVV) y potato mop-top virus (PMTV) [6,7,8,9,10]. Adicionalmente, es frecuente el reporte de infecciones mixtas entre PVY, PVS, PLRV y PYVV [10]. Así, por ejemplo, en trabajos realizados sobre brotes de tubérculos-semilla var. Diacol Capira empleando la técnica RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) se encontraron niveles de infección viral del 100%, 93,75% y 83,3% para PVY, PVX y PLRV, respectivamente [7,11].

Con el fin de evaluar los niveles de infección de los virus PVY, PVS, PVX, PYVV y PLRV y sus posibles infecciones mixtas en tubérculos-semilla de papa var. Diacol Capira, en el presente estudio se evaluaron mediante RT-qPCR,

siete lotes semilla certificada o registrada (TC) comercializadas en el oriente Antioqueño y siete lotes de semilla no comercial (TNC) obtenidos por agricultores en sus fincas o en mercados locales; la afinidad filogenética de las cepas de los virus detectados fue también determinada a partir de secuencias Sanger de la cápside viral.

MÉTODO

Muestras

Las muestras de tubérculos-semilla de papa var. Diacol Capira fueron colectadas en los municipios del Oriente Antioqueño (Antioquia, Colombia): La Ceja (2200 msnm, humedad relativa 98%, 16°C, 6°01'40"N 75°25'52"O), La Unión (2500 msnm, humedad relativa 98%, 14,5°C, 5°58'22"N 75°21'40"O), Santuario (2150 msnm, humedad relativa 97%, 15,9°C, 6°08'15"N 75°15'50"O) y Marinilla (2120 msnm, humedad relativa 98%, 16,4°C, 6°10'28"N 75°20'20"O), y correspondieron a siete lotes de semilla comercial (certificada o registrada) (TC) en estado de brotación y siete lotes de semilla no comerciales (TNC) (obtenidos por agricultores en sus fincas o en mercados locales). Cada muestra consistió en tres tubérculos obtenidos al azar del respectivo lote de semillas, para un total de 42 muestras analizadas. Una vez en el laboratorio, se obtuvieron 100 mg de brotes para la extracción de ácidos nucleicos y los mismos tres tubérculos fueron sembrados individualmente en bolsas con aproximadamente un (1) kg de suelo y mantenidos bajo condiciones de casa malla antiáfidos por cuatro semanas, para proceder a la extracción de sus ácidos nucleicos, pero en este caso a partir de tejido foliar.

Detección de virus por RT-qPCR

A cada una de las 42 muestras de brotes de tubérculos-semilla y el respectivo tejido foliar de las plantas mantenidas en casa malla, se les realizó la extracción del ARN total utilizando el método del Trizol (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) a partir de 100 mg de tejido, previa maceración con nitrógeno líquido y eluido en 40 µL de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC). Su concentración y pureza se evaluó con lecturas a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo-Fisher Scientific). La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó en un volumen de 20 µL a 42°C por 1 h a partir de 200 U de la enzima RevertAid Reverso Transcriptasa (RT) (Thermo-Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de RiboLock inhibidor de ARNasas, 100 ng de ARN total y 100 pmol de cada primer reverso, que para el caso de PVY, PVS y PVX correspondió al Oligo-(dT)18; mientras que para PVV se usó el primer qPYVV_R_CP (5' AGG TCT CAG GAT CTG GAT CAA CT 3') [12] y para PLRV el primer PLRV-R (5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT 3') [13]. En la amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) se empleó el kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo-Fisher Scientific) con 50-100 ng de ADNc y 0,3 µM de los primers específicos PVY-1_FP (5' CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C 3') y PVY-1_RP (5' ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A 3') [14], PVS_gen_F (5' ATG CCG CCY AAA CCA GAT CC 3') y qPVS_gen_R (5' AGC ATK GCT TCY TCA TTT TGC CCT G 3') [15], PVX_101-2_FP (5' AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC 3') y PVX_101-2_RP (5' GCT TCA GAC GGT GGC CG 3') [16], PYVV_F_CP (5' TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG 3') y qPYVV_R_CP [14] y PLRV-Sense (5' GCT CAA GCG AGA CAT TCG TG 3') y PLRV-Antisense (5' TTG AAT GCC GGA CAG TCT GA 3') [17]. El programa de amplificación consistió de un paso de activación de la enzima a 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s y 52°C por 45 s, en un equipo Rotor-Gene Q-5plex (Qiagen, Alemania). Una vez finalizado el programa, se obtuvieron los valores de ciclo umbral (Ct) y temperatura de fusión (Tm) en el rango 50-99°C, utilizando el software del equipo. En todas las reacciones se incluyó un control positivo procedente de tejidos foliares infectados con cada virus evaluado y un control negativo derivado de tejidos foliares libres de virus.

Identificación de virus por RT-PCR convencional y secuenciación Sanger

Se realizó la amplificación de la región codificante de la cápside (CP) de al menos tres cepas de cada virus por RT-PCR convencional y secuenciación Sanger, utilizando los primers: PVY-F (5' ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC 3')

y PVY-R (5' TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT 3') [18], PVS_gen_F y PVS_gen_R (5' ACC TTC ART ATG ACK CCA AGC AAC ATG C 3') [15], PVXF (5' TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG 3') y PVXR (5' GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC 3') [18], PYVV_F_CP y PYVV_R_CP (5' AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G 3') [12] y PLRV-F (5' CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC 3') y PLRV-R (5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT 3') [13]. Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL con 1X de buffer de enzima (10X), 0,2 mM de cada dNTP, 1,8 mM de MgCl₂, 1 U de Taq ADN polimerasa (Thermo-Fisher Scientific), 0,2 µM de los primers y 1 µL de ADNc, el cual fue obtenido como se describió anteriormente. El programa consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 50 s, 52°C por 50 s, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones del tamaño esperado para PVY (480 pb), PVS (421 pb), PVX (562 pb), PYVV (495pb) y PLRV (330 pb) fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,7%, suplementado con GelRed 1X (Biotium, EEUU) y visualizados en un equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EEUU). Las bandas fueron purificadas directamente del gel utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo-Fisher Scientific) y secuenciadas en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen (Corea del Sur). A partir de las secuencias obtenidas se generaron los consensos para la región CP y su posterior alineamiento con el programa MUSCLE [19] "type": "article-journal", "volume": "32", "uris": ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=9b77ccf1-aca7-4240-b826-60bc0fac8720"], "mendeley": {"formattedCitation": "[20]", "plainTextFormattedCitation": "[20]", "previouslyFormattedCitation": "[20]", "properties": {"noteIndex": 0}, "schema": "https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json"} con respecto a secuencias disponibles en GenBank de cepas previamente reportadas en Colombia y en otros países. Finalmente, dichos alineamientos fueron utilizados para generar matrices de identidad a nivel de nucleótidos y los análisis filogenéticos utilizando el método de Máxima verosimilitud con el modelo de sustitución T92+I con 1000 réplicas de *bootstrap* empleando el software MEGA7 [20].

Análisis estadístico

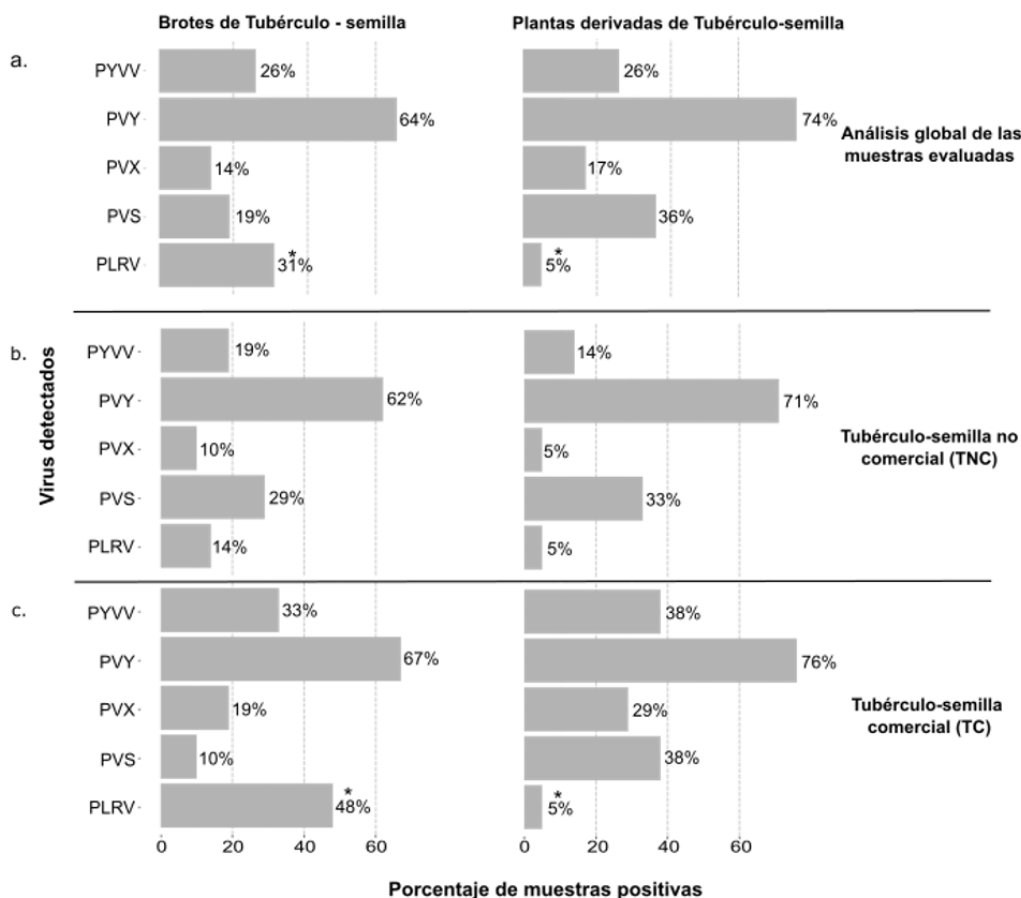
Para el experimento de detección de virus en tubérculos y en las plantas derivadas de éstos, se analizaron los datos a partir de una prueba de ANOVA con un nivel de significancia de $p=0,05$ utilizando la prueba Friedman, con el fin de detectar diferencias significativas para la detección de cada virus entre tubérculos-semilla y las plantas bajo condiciones de casa malla y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (nivel de significancia de $p<0,05$) para las comparaciones entre tubérculos-semilla comerciales y tubérculos-semilla no comerciales. Estos análisis se realizaron con el programa RStudio versión 3.6.3.

RESULTADOS

Detección de virus por RT-qPCR

De manera global, los virus PVY y PLRV fueron los de mayor prevalencia en los tubérculos-semilla evaluados, con niveles de 64% y 31% respectivamente; seguidos de PYVV (26%), PVS (19%) y PVX (14%) (Figura 1a). Estos resultados de infección viral en material de siembra de papa en Colombia se suman a los reportados por García *et al.* (2016) [7] y Mesa *et al.* (2016) [11], quienes encontraron para PVY una prevalencia del 100%, para PVX del 93,75% y para PLRV del 83,3%, y resultan muy preocupantes para la agroindustria de producción de papa en Colombia. Al realizar nuevamente la evaluación sobre las plantas derivadas de dichos tubérculos, los porcentajes de detección aumentaron en un 10% para PVY (74%), 17% para PVS (36%) y 3% para PVX (17%), mientras que para PYVV no se evidenció ningún incremento en la detección. Sin embargo, los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre ambos tipos de evaluaciones (brotes de tubérculos-semilla y tejido foliar de plantas) ($p=0,73$, $p=0,17$, $p=1$ y $p=0,8$, respectivamente). Una situación contraria se encontró para la detección del PLRV, pues en los brotes del tubérculo-semilla se detectó en el 31% de las muestras, mientras que en el tejido foliar de las plantas derivadas tan sólo se encontró en el 5% de éstas, lo que resultó en el hallazgo de diferencia estadística significativa ($p=0,004$) entre ambos tipos de muestras (Figura 1.b,c).

Figura 1. Porcentaje (%) de muestras de brotes y plantas de papa derivadas de tubérculos-semilla comerciales (TC) y no comerciales (TNC) que resultaron positivas para los virus PLRV, PVS, PVX, PVY y PVV por RT-qPCR. * Diferencia estadísticamente significativa empleando la prueba de Friedman.



Al compararse los niveles de prevalencia de cuatro de los cinco virus entre las muestras TC y TNC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas procedencias del material de siembra. Así, PVY se detectó con un nivel de infección de 67% (TC) y 62% (TNC) ($p=0,728$); PVS en 10% (TC) y 29% (TNC) ($p=0,147$); PVX en 19% (TC) y 10% (TNC) ($p=0,341$) y PVV 33% (TC) y 19% (TNC) ($p=0,482$). Sin embargo, se observaron altos niveles de prevalencia de los virus en el material de siembra TC respecto a los TNC, lo que puede estar asociado a la selección positiva que hacen los agricultores sobre sus lotes y a problemas con la detección de los virus durante el esquema de certificación de semilla [21].

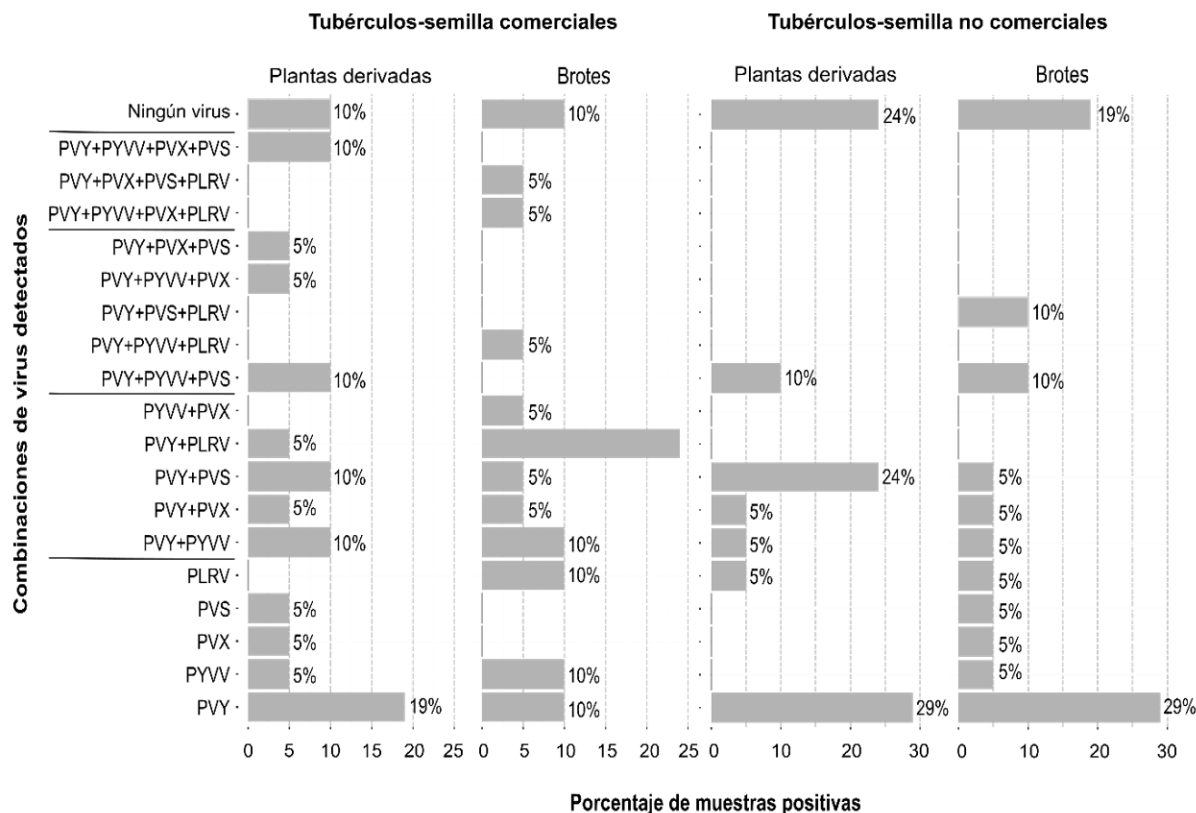
Por su parte, los niveles de infección detectados entre dichos materiales para el virus PLRV mostraron diferencia estadística significativa ($p=0,01$), con valores de 48% (TC) y 14% (TNC) y al compararse la detección en sus plantas derivadas, nuevamente ésta disminuyó a niveles del 5% para TC y TNC (Figura 1b, c). Este resultado en particular puede deberse al hecho que el PLRV es un virus limitado al floema de las plantas, por lo que su título en tejido foliar puede ser muy bajo, dificultándose su detección en el mesófilo [22], e indica la necesidad de realizar su detección en plantas directamente sobre haces vasculares como en peciolo y tallos y preferiblemente en brotes de tubérculos, cuando el objetivo de la evaluación sea la certificación del material de siembra de papa.

Los análisis realizados para los valores de Ct de las pruebas de RT-qPCR, señalaron variaciones menores para este parámetro entre los virus detectados, tanto sobre los brotes de los tubérculos como en sus plantas deri-

vadas. El virus encontrado en mayor título viral (menor Ct) fue el PVY, con un Ct promedio de 25,84 (SD=6,45) para los brotes de tubérculos, y de 27,8 (SD=8,03) para el tejido foliar de sus plantas derivadas; mientras que para PVS, PVV, PVX y PLRV éstos valores fueron de 26,06 (SD=6,73) y 31 (SD=7,9); 31,63 (SD=5,3) y 30,71 (SD=4,78); 32,46 (SD=3,92) y 32,51 (SD= 5,74); y 33,3 (SD=3,21) y 35 (SD=0), respectivamente. La naturaleza viral de los amplicones obtenidos mediante RT-qPCR fue confirmada mediante análisis de las curvas de fusión empleando la herramienta HRM (*High Resolution Melting*). La comparación de dichos valores con respecto al rango de temperaturas reportadas en Colombia para cada virus, correspondió a los valores esperados; así, para PVY se encontraron valores de $T_m=77,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$ ($77,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, [9]); para PVS de $87,5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($T_m= 86,96 \pm 1^\circ\text{C}$; [9]); mientras que para PVX se presentaron dos valores de T_m ($80,5 \pm 1^\circ\text{C}$ y $83,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$) correspondientes a dos variantes registradas para este virus ($T_m= 79,5 \pm 1^\circ\text{C}$ y $T_m= 83,7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; [8]). Finalmente, para PVV el T_m fue de $77,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ($T_m=77,28 \pm 0,6^\circ\text{C}$; [9]) y para PLRV el valor promedio de T_m fue de $80 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ($T_m= 81,8^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$ [9]). Por otra parte, todos los controles positivos empleados en el estudio resultaron en amplificaciones efectivas con valores de Ct inferiores a 30 y T_m correspondientes a los rangos indicados; mientras que en los controles negativos no se detectó amplificación para ninguno de los virus.

Un aspecto que llama la atención de los resultados obtenidos es la ocurrencia de infecciones mixtas en los tubérculos-semilla evaluados y en sus plantas derivadas (Figura 2). Para brotes de tubérculos (TC), la combinación de PVY+PLRV presentó el mayor nivel de detección con un valor de 24%, mientras que la infección mixta PVY+PVV se encontró en el 10% de las muestras y PVY+PVX, PVY+PVS, PVV+PVX, PVY+PVV+PLRV, PVY+PVV+PVX+PLRV, PVY+PVX+PVS+PLRV en el 5% de éstas. Para el caso de las plantas derivadas de dichos tubérculos-semilla (TC), se encontraron en el 10% de las plantas las infecciones mixtas: PVY+PVV, PVY+PVS, PVY+PVV+PVS y PVY+PVV+PVX+PVS; mientras que las combinaciones PVY+PVX, PVY+PLRV, PVY+PVV-

Figura 2. Porcentaje (%) de muestras de papa con infecciones únicas y mixtas de virus en brotes y plantas derivadas de tubérculos-semilla comerciales (TC) y no comerciales (TNC), utilizando la prueba de RT-qPCR.



V+PVX y PVY+PVX+PVS se detectaron en el 5% de éstas. Finalmente, en el 10% de las muestras para los tubérculos-semilla comerciales y sus plantas derivadas no se detectó ninguno de los virus evaluados en este estudio. Para el caso de los tubérculos-semilla (TNC), las muestras infectadas con los virus PVY+PVV+PVS alcanzaron un porcentaje de detección del 10% y en un 5% lo fueron para las combinaciones PVY+PVX y PVY+PVV. Interesantemente, la detección de PVY+PVS en estas muestras (TNC), arrojó un valor del 5% en tubérculos-semilla y del 24% en sus plantas derivadas. Por último, en el 19% de los tubérculos-semilla y en el 24% de sus plantas derivadas no se encontró ninguno de los virus bajo estudio (Figura 2).

Estos resultados evidencian que la sanidad viral de los materiales de siembra comercializados como certificados o registrados en el oriente Antioqueño superan dramáticamente los umbrales de detección permitidos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), entidad regulatoria en Colombia, mediante la Resolución 3168 de 2015; aunque en dicha normativa se utiliza la observación visual de síntomas y en algunos casos la prueba de ELISA como referentes de evaluación. Sin embargo, es importante señalar que diversos estudios han demostrado que la sensibilidad de la técnica de RT-qPCR para la detección de virus en plantas puede representar con respecto a pruebas de ELISA, niveles de detección superiores en el rango de 10.000 a 100.000.000 veces [5,22], por lo que resultaría deseable que este organismo de sanidad vegetal incluya la utilización de pruebas moleculares en su normatividad para certificación de semilla por su sanidad viral [23].

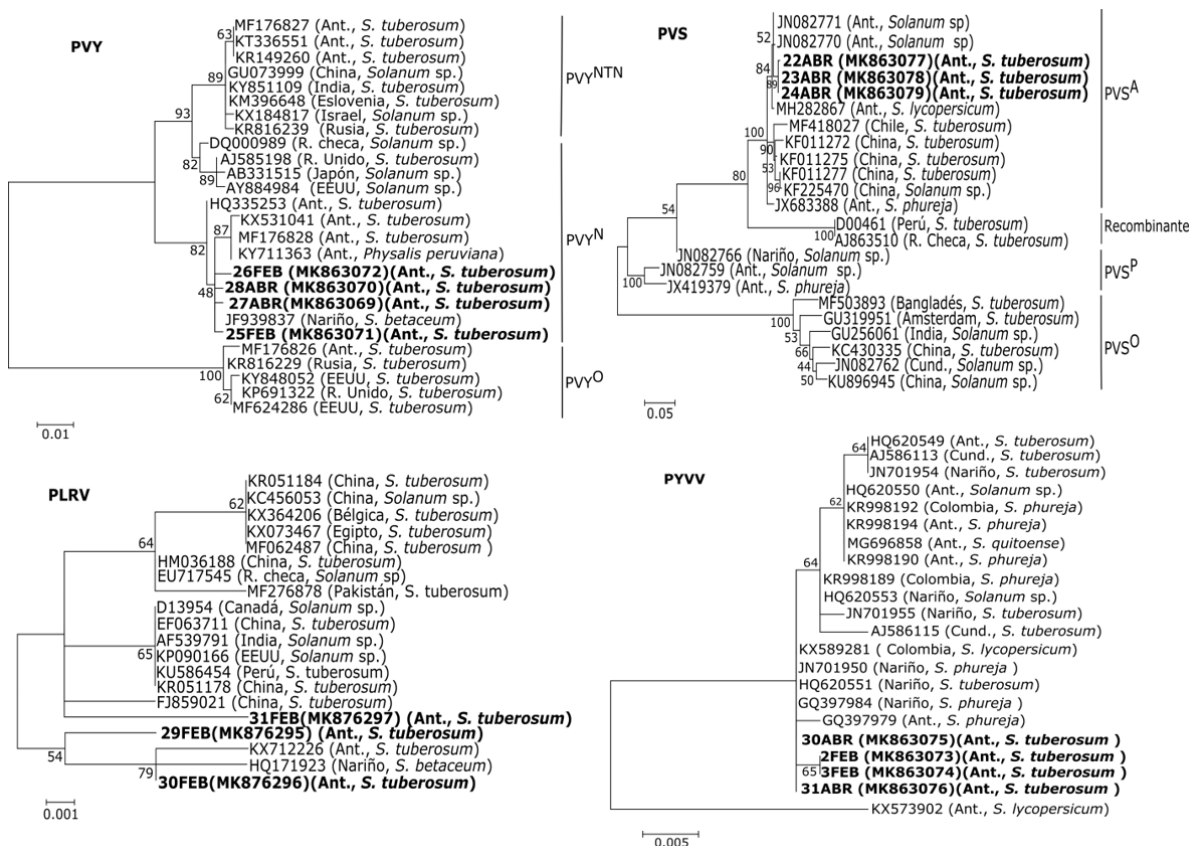
Los niveles de infección viral encontrados en material de siembra de papa, sugieren que este factor es uno de los que más incide en los bajos rendimientos obtenidos en Colombia para este cultivo (20,8 t/ha) [24]; pues se ha reportado que tubérculos infectados con PVY pueden conducir a reducciones en los rendimientos de papa del 20 al 50%, mientras que PVX puede ocasionar pérdidas del 10 al 50% y PVS de entre 10 y 20%. Para el caso de las infecciones mixtas de PVS+PVX, PVY+PVX y PVY+PLRV las pérdidas pueden incluso llegar hasta el 90% [9,25]. Es de resaltar que, al compararse los niveles de infección entre la semilla comercial y no comercial, ésta última presentó menos combinaciones de especies virales y en algunos casos menores niveles de infección, lo que nuevamente indica graves problemas con la producción de semilla certificada en el país y también sugiere un posible efecto de la selección positiva realizada por los agricultores que obtienen su propia semilla. Este proceso consiste en identificar plantas o lotes asintomáticos con excelentes características fenotípicas, para su utilización como material de siembra en el siguiente ciclo de cultivo [26].

Los resultados obtenidos en este estudio deben llamar la atención de los organismos de sanidad vegetal del país, productores de papa, semilleros y agricultores para que tomen acciones inmediatas que ayuden a mejorar los niveles de sanidad viral de los materiales de siembra certificado, incluyendo aspectos claves como la evaluación del material *in vitro* y de los minitubérculos que son empleados en las primeras etapas del proceso de certificación, utilizando pruebas altamente sensibles como la RT-qPCR empleada en este estudio, aumentar el seguimiento y apoyo técnico por parte del ICA a los lotes destinados para la producción de semilla en las fases de campo, promover las prácticas de selección positiva en cultivos de papa y eliminar tempranamente focos de plantas con síntomas de infecciones virales, no sólo en lotes destinados a la producción de semilla, sino para la producción comercial de tubérculos.

Identificación de virus por secuenciación Sanger

Adicionalmente a la detección de virus realizada utilizando RT-qPCR, se obtuvieron al menos tres amplicones de CP para los virus PVY (480 pb), PVS (421 pb), PVV (495pb) y PLRV (330 pb) mediante RT-PCR convencional. Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank y los números de acceso se presentan en la Figura 3. Para el caso de PVX, del cual se esperaba un amplicon de 562 pb, no fue posible su obtención aún después de múltiples modificaciones del procedimiento de RT-PCR, lo que sugiere la necesidad de diseñar nuevos primers específicos, con base en los genomas de las cepas de este virus reportadas en GenBank para Colombia y otros países andinos.

Figura 3. Árboles filogenéticos generados a partir de las secuencias de la cápside viral de PVY, PVS, PLRV y PYVV procedentes de plantas derivadas de tubérculos-semilla del oriente antioqueño.



Las secuencias resultantes fueron empleadas para realizar análisis de identidad genética con respecto a secuencias disponibles en GenBank de cepas previamente reportadas en Colombia y en otros países (Figura 4). Para el virus PVY, se encontraron muy pocas variaciones entre las cuatro secuencias obtenidas (>99,3%) y se observó una alta afinidad filogenética con cepas de la raza PVY^N (raza necrosante), compartiendo niveles de identidad de entre 96 y 99%, especialmente con aquellas previamente reportadas por Riascos *et al.* (2018) [6] y Álvarez *et al.* (2018) [27] en el departamento de Antioquia (Figura 4) en *S. tuberosum* y *P. peruviana*, respectivamente. PVY es considerado uno de los virus responsables de la degeneración de los tubérculos-semilla ocasionando reducciones en los rendimientos entre el 29 y 85% [2]. Con referencia al virus PVS, se encontraron niveles de identidad de 98,7 a 99,4% con respecto a aislamientos de PVS^A y en el análisis filogenético éstas se agruparon con un valor de *bootstrap* del 100%, en el clado correspondiente al linaje Andino en conjunto con cepas infectando papa criolla (*S. phureja*) y tomate (*S. lycopersicum*). Por su parte, el árbol filogenético obtenido para PLRV agrupó las secuencias en un subclado conformado por cepas de este virus previamente registradas en los departamentos de Antioquia y Nariño y obtenidas tanto sobre papa como en tomate de árbol (*S. betaceum*), con una identidad genética superior al 98%. Finalmente, las secuencias obtenidas para PYVV compartieron el 99% de identidad para la región CP con cepas aisladas de papa, papa criolla y tomate, reportadas en los departamentos de Antioquia, Nariño y Cundinamarca [28], adicionalmente, presentaron un 99,3% de identidad con respecto a un aislamiento de PYVV en lulo (*S. quitoense*) (Figuras 3 y 4) [29, 30].

Figura 4. Matrices de identidad genética para secuencias de la cápside de los virus PVY, PVS, PLRV y PVV obtenidas en plantas derivadas de tubérculos-semilla de papa y de otros hospedantes reportados en GenBank.

PVY										
27ABR										
28ABR	99,5									<i>S. tuberosum</i>
25FEB	99,5	99,5								
26FEB	99,3	99,3	99,3							
China	96,2	96,2	96,2	96						
Yarumal	96	96	96	95,8	99,7					PVY ^{NTN}
La Unión	99,1	99,1	99,1	98,8	95,8	95,5				PVY ^N
R. Checa	96,6	96,6	96,6	96,4	98,6	98,4	96,2			
USA	92	92	91,6	91,8	90,9	90,7	90,5	90,7		
R. Unido	91,8	92,2	91,8	92	91,1	90,9	90,7	90,9	99,7	PVY ^O

PVS										
22ABR										
23ABR	99,7									<i>S. tuberosum</i>
24ABR	99,7	100								
Antio.	98,9	99,2	99,2							PVS ^A
Antio.	98,9	98,7	98,7	99,4						
Perú	85,2	85,4	85,4	86,2	86,2	Recombinante				
Nariño	87	86,7	86,7	87,5	88	81,6				PVS ^P
Antio.	78,7	78,2	78,2	78,7	79,2	77,2	89,1			
Cundi.	75,9	75,6	75,6	75,9	76,4	76,9	76,9	79,5		
China	76,6	76,4	76,4	76,6	77,2	77,4	77,9	78,7	95,3	PVS ^O

PLRV										
29FEB										
30FEB	99,3									<i>S. tuberosum</i>
31FEB	99,6	99								
Nariño	99	99,6	98,7							<i>S. betaceum</i>
Antio.	98,3	99	98,7	98,7						
Antio.	99	99,6	98,7	99,3	98,7					
Cundi.	98,7	99,3	99	99	99,6	99				
Perú	99	99	99,3	98,7	99,3	98,7	99			<i>S. tuberosum</i>
China	99	99	99,3	98,7	98,7	98,7	99	99,3		
Canadá	99	99	99,3	98,7	99,3	98,7	99	100	99,3	

PVV										
2FEB										
3FEB	100									
30ABR	99,7	99,7								<i>S. tuberosum</i>
31ABR	99,7	99,7	100							
Cundi.	99,1	99,1	99,3	99,3						
Colomb.	99,7	99,7	100	100	99,3					
Antio.	95,9	95,9	96,1	96,1	95,5	96,1				<i>S. lycopersicum</i>
Nariño	99,7	99,7	100	100	99,3	100	96,1			<i>S. phureja</i>
Nariño	99,7	99,7	100	100	99,3	100	96,1	100		
Antio.	99,3	99,3	99,5	99,5	99,7	99,5	95,7	99,5	99,5	<i>S. quitoense</i>

CONCLUSIONES

En este trabajo utilizando la técnica RT-qPCR se detectó la infección de los virus PVY (64%), PVS (19%), PVX (14%), PLRV (31%) y PVV (26%) a partir de brotes de tubérculo semilla comercial y no comercial de la var. Diacol Capira. Cuando se evaluaron las plantas derivadas de este material luego de cuatro semanas, dichos valores aumentaron para tres de los virus (PVY: 74%, PVS: 36%, PVX: 17%); permanecieron iguales para PVV (26%) y disminuyeron para PLRV (5%), lo que ofrece una recomendación práctica sobre los tejidos más apropiados para la detección de dichos virus en material de siembra de papa.

En las evaluaciones de las infecciones mixtas de virus según el tipo de tubérculo-semilla (comercial y no comercial) y el tejido empleado para su detección (brotes de tubérculo y tejido foliar de sus plantas derivadas), se observaron muestras que presentaban la infección de hasta cuatro virus, lo que señala la necesidad de tomar acciones inmediatas que ayuden a mejorar los niveles de sanidad viral de los materiales de siembra de papa utilizados en Colombia.

Utilizando RT-PCR convencional y secuenciación Sanger se logró obtener al menos tres secuencias de la región de la cápside para los virus PVY, PVS, PLRV y PVV. Los análisis de variabilidad genética derivados de dichas secuencias indicaron bajos niveles de variación entre las cepas obtenidas, y su afinidad filogenética con subclados previamente reportados para cada uno de estos virus en Antioquia, Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Dirección de investigación en innovación de la Universidad CES y por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) y contó con la asesoría estadística del Profesor Guillermo Correa Londoño de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNAL-MED.

REFERENCIAS

- [1] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (MADR). Indicadores e Instrumentos Enero 2018 Indicadores Generales. 2018. Disponible en: <https://www.minagricultura.gov.co/paginas/default.aspx>. [citado 11 de marzo de 2019].
- [2] BUDDENHAGEN, CHRIS; HERNANDEZ-NOPSA, JOHN-FREDY; ANDERSEN, KELSEY; ANDRADE-PIEDRA, JORGE; FORBES, GREGORY-ALLAN; KROMANN, PETER; THOMAS-SHARMA, SARA; USECHE, PILAR; GARRETT, KAREN. Epidemic Network Analysis for Mitigation of Invasive Pathogens in Seed Systems: Potato in Ecuador. *Ecology and Epidemiology*, v. 107, n. 1, 2017, p. 1209-1218. 10.1094/PHYTO-03-17-0108-FI
- [3] NAVARRETE, ISRAEL; PANCHI, NANCY; KROMANN, PETER; FORBES, REGORY; ANDRADE-PIEDRA, JORGE. Health quality of seed potato and yield losses in Ecuador. *Revista Latinoamericana la papa*, v. 21, n. 2, 2017, pp. 69-88. <https://doi.org/10.1101/108712>
- [4] COLOMBIA. SISTEMA DE INFORMACIÓN DE GESTIÓN Y DESEMPEÑO DE LAS ORGANIZACIONES DE CADENAS (SIOC). El Sistema de Información de Gestión y Desempeño de las Organizaciones de Cadenas. 2020. Diponible. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Papa>. [citado 24 de agosto de 2020].
- [5] NIKITIN, M.M.; STATSYUK, N.V.; FRANTSUZOV, P.A.; DZHAVAKHIYA, V.G.; GOLIKOV, A.G. Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, n. 3, 2018, p. 797-809. <https://doi.org/10.1111/jam.13686>
- [6] RIASCOS-CHICA, MELISSA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; MARIN-MONTOYA, MAURICIO-ALEJANDRO. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, v. 23, n. 1, 2018, p. 39-50. 10.15446/abc.v23n1.65683
- [7] GARCÍA-RUIZ, DANIELA; OLARTE-QUINTERO, MANUEL-ANDRES; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Detección serológica y molecular del Potato virus X (PVX) en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. Bukasov) en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 18, n. 1, 2016, p. 1-8. 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389
- [8] MEDINA, HÉCTOR-CAMILO; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN, MAURICIO. Detection and sequencing of Potato virus Y (PVY) and Potato leafroll virus (PLRV) in a volunteer plant of *Solanum tuberosum* L. cv. Diacol-Capiro. *Acta Agronómica*, v. 66, n. 1, 2017, p. 625-632. 10.15446/acag.v66n4.59753
- [9] GALLO-GARCÍA, YULIANA-MARCELA; SIERRA-MEJÍA, ANDREA; DONAIRE-SEGARRA, LIVIA; ARANDA, MIGUEL; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARIN, MAURICIO. Natural coinfection of RNA viruses in potato (*Solanum tuberosum* subsp. Andigena) crops in Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, v. 24, n. 3, 2019, p. 546-560. 10.15446/abc.v24n3.79277
- [11] MESA-MEDINA, MAURICIO; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, MARTHA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Diagnóstico serológico y molecular del *Potato leafroll virus* (PLRV) en tubérculos-semilla de papa en Antioquia, Colombia. *Acta Agronómica*, v. 65, n. 2, 2016, p. 204-210. 10.15446/acag.v65n2.50764
- [12] ÁLVAREZ-YEPES, DANIELA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PYVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro*, v. 29, n. 1, 2017, p. 3-14.
- [13] SINGH, R.P.; KURZ, J.; BOITEAU, G.; BERNARD, G. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potencial epidemiological application. *Journal of Virological Methods*, v. 1, n. 506, 1995, p. 133-143. 10.1016/0166-0934(95)00056-Z

- [14] SIERRA-MEJÍA, ANDREA; GALLO-GARCÍA, YULIANA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO-ALEJANDRO. Design of primers for specific detection of Potato Virus Y (PVY) by RT-PCR. *Acta Biologica Colombiana*, v. 24, n. 3, 2019, p. 561-565.
10.15446/abc.v24n3.76523
- [15] VALLEJO, DANIELA; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN, MAURICIO. Genome characterization of a Potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agronomía Colombiana*, v. 34, n. 1, 2016, p. 51-60.
10.15446/agron.colomb.v34n1.53161
- [16] AGINDOTAN, BRIGHT; SHIEL, PATRICK; BERGER, PHILIP. Simultaneous detection of potato viruses PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 142, 2007, p. 1-9.
10.1016/j.jviromet.2006.12.012
- [17] YANG, LIJIE; NIE, BIHUA; LIU, JUN; SONG, BOTAO. A Reexamination of the effectiveness of Ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets in vitro using ELISA and quantitative RT-PCR. *The American Journal of Potato Research*, v. 91, n. 3, 2013, p. 304-311.
10.1007/s12230-013-9350-z
- [18] NIE, X.; SINGH, R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *Journal of Virological Methods*, v. 91, 2001, p. 37-49.
10.1016/S0166-0934(00)00242-1
- [19] ROBERT, EDGAR. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Journal Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 5, 2004, p. 1792-1797. 10.1093/nar/gkh340
- [20] KUMAR, SUDHIR; STECHER, GLEN; TAMURA, KOICHIRO. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, 2016, p. 1870-1874.
10.1093/molbev/msw054
- [21] PRIEGNITZ, UTA; LOMMEN, WILLEMEN; VAN DER VLUGT, RENÉ; STRUIK, PAUL. Impact of positive selection on incidence of different viruses during multiple generations of potato seed tubers in Uganda. *Potato Research*, v. 62, n. 1, 2019, p. 1-30.
10.1007/s11540-018-9394-z
- [22] SADAWARTI, MURLIDHAR; SINGH, RAJESH; SAMADHIYA, R.K.; SINGH, S.P.; ROY, S.; SINGH, VINAY; RAWAL, SANJAY; BUCKSETH, TANUJA; KUMAR, RAJ; CHAKRABARTI, S.K. Revisiting of planting dates for maximizing seed size potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield as per changing climatic scenario. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, v. 89, n. 4, 2019, p. 646-652.
- [23] GULUMA, DEJENE-ABERA. Factors affecting potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber seed quality in mid and highlands: A Review. *International Journal of Agriculture & Agribusiness*, v. 7, n. 1, 2020, p. 24-40.
- [24] ITALIA. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). FAOSTAT. 2019. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. [citado 24 de agosto de 2020].
- [25] ZHANG, WEI; ZHANG, ZHIXIANG; FAN, GUOQUAN; GAO, YANLING; WEN, JINGZHI; YANJU, BAI; QIU, CAILING; ZHANG, SHU; SHEN, YU; MENG, XIANXIN. Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses. *Journal of General Plant Pathology*, v. 83, n. 1, 2017, p. 33-45.
10.1007/s10327-016-0688-1
- [26] PRIEGNITZ, UTA; LOMMEN, WILLEMEN; VAN DER VLUGT, RENÉ; STRUIK, PAUL. Impact of positive selection on incidence of different viruses during multiple generations of potato seed tubers in Uganda. *Potato Research*, v. 62, n. 1, 2019, p. 1-30.
10.1007/s11540-018-9394-z
- [27] ÁLVAREZ-MESA, NATALIA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; JARAMILLO-MESA, HELENA; GALLO, YULIANA; MARÍN, MAURICIO. Molecular characterization of Potato virus Y (PVY) and Potato virus V (PVV) (*Potyvirus*, *Potyviridae*) naturally infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in Antioquia (Colombia). *Agronomía Colombiana*, v. 36, n. 1, 2018, p. 13-23.
10.15446/agron.colomb.v36n1.65051

- [28] CUADROS, DIEGO; HERNANDEZ, ANNGIE; TORRES, MARÍA; TORRES, DIANA; BRANSCUM, ADAM; RINCON, DIEGO. Vector transmission alone fails to explain the potato yellow vein virus epidemic among potato crops in Colombia. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. 1654, 2017, p. 1-8.
10.3389/fpls.2017.01654
- [29] GALLO, YULIANA; TORO, LUISA-FERNANDA; JARAMILLO, HELENA; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN, MAURICIO. Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 12, n. 2, 2018, p. 281-292.
10.17584/rcch.2018v12i2.7692
- [30] HANCINSKY, RICHARD; MIHÁLIK, DANIEL; MRKVOVÁ, MICHAELA; CANDRESSE, THIERRY; GLASA, MIROSLAV. Plant Viruses Infecting Solanaceae Family Members in the Cultivated and Wild Environments: A Review. *Plants*, v. 9, n. 667, 2020, p. 2-27.
10.3390/plants9050667

Sciencometric outlook of the biotechnology in the agricultural and agroindustrial sector*

Panorama cienciométrico de la biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial

Panorama cienciométrico da biotecnologia no setor agropecuário e agroindustrial

VALVERDE-VALVERDE, MARIA-ANGELICA¹; DELGADO-HURTADO, CAROLINA²;
RENGIFO-RODAS, CARLOS-FELIPE³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 18 de Diciembre 2019.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Origin project: "Estudios Bibliométricos y Cienciométricos de los Resultados de la Actividad Científica Asociada a la Universidad del Cauca durante el periodo (2013-2017). Financing: Universidad del Cauca (501100005682) under Grant (5038), Ending: 15th of December 2020.

- 1 Universidad del Cauca, Vicerrectoría de Investigaciones. Administradora de Empresas. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0341-4340>
- 2 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Contables, Económicas y Administrativas. Ph.D en Ingeniería Industrial. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9550-3721>
- 3 Universidad del Cauca, Facultad de Ingeniería Electrónica y Telecomunicaciones. Ph.D en Robótica, Automática y Tratamiento de Señales. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0601-3481>

Correspondencia: mariaval@unicauca.edu.co

Cómo citar este artículo: VALVERDE-VALVERDE, MARIA-ANGELICA; DELGADO-HURTADO, CAROLINA; RENGIFO-RODAS, CARLOS-FELIPE. Sciencometric outlook of the biotechnology in the agricultural and agroindustrial sector. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 79-91. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)79-91](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)79-91)

ABSTRACT

This article presents Scientometrics as a major element in quantitatively addressing the study of a field of knowledge. This study seeks to combine complementarily and integrally the bibliometry with the technological outlook to obtain an image of the current state of biotechnology in a specific area. This contributes with a trend-setting in a socially relevant sector that currently addresses global challenges such as climate change and energy and food security. Through a bibliometric study, it determines the dynamics of the scientific production, key authors, country participation and language trends in the domain of Biotechnology in the agricultural and agro-industrial sectors. In addition, a technological outlook is presented, in which, based on the analysis of trends in patents, the innovative state of the area is established. The main result is associated with the dynamics of scientific production, which according to the Lotka law; states that the percentage of authors who produce N articles is inversely proportional to a power of N. The technological outlook is consistent with the Latin American studies, concluding that, despite of the increasing dynamics, there is a poor development of technology in the sector.

RESUMEN

El presente artículo presenta la cienciometría como elemento principal para abordar cuantitativamente el estudio de un campo del conocimiento. Busca combinar la bibliometría con el panorama tecnológico, para obtener el estado actual de la biotecnología en un área específica. Esto contribuye al establecimiento de tendencias en un sector socialmente pertinente para abordar desafíos globales como el cambio climático y la seguridad energética y alimentaria. A través de un análisis bibliométrico, se determinó la dinámica de la producción científica, los autores clave, la participación de los países y las tendencias de idioma en el dominio de la Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Como complemento, se presenta un panorama tecnológico, en el cual, a partir del análisis de tendencias en patentes, se logra establecer el grado de innovación en el área. El principal resultado en concordancia con la ley de bibliométrica de Lotka, establece que el porcentaje de autores que producen N artículos es inversamente proporcional a una potencia de N. El panorama tecnológico, es consistente con los estudios de Latinoamérica, concluyéndose que, a pesar de presentarse una dinámica creciente, existe un bajo desarrollo propio de tecnología en el sector.

RESUMO

Este artigo apresenta a cienciometria como o elemento principal para abordar quantitativamente o estudo de um campo de conhecimento. Busca combinar a bibliometria com o cenário tecnológico, para obter o estado atual da biotecnologia em uma área específica. Isto contribui para a definição de tendências num sector socialmente relevante para enfrentar desafios globais como as alterações climáticas e a energia e a segurança alimentar. Uma análise bibliométrica determina a dinâmica da produção científica, autores-chave, participação do país e tendências linguísticas no domínio da Biotecnologia no sector agrícola e agroindustrial. Além disso, apresenta-se um cenário tecnológico,

KEY WORDS:

Bibliometric Analysis;
Technology Study; Patent Study.

PALABRAS CLAVE:

Análisis Bibliométrico; Estudio
Tecnológico; Estudio de Patentes.

PALAVRAS-CHAVE:

Análise Bibliométrica; Estudo
Tecnológico; Estudo de Patentes.

no qual, a partir da análise das tendências das patentes, o grau de inovação na área é estabelecido. O principal resultado de acordo com a lei bibliométrica de Lotka afirma que a porcentagem de autores que produzem artigos N é inversamente proporcional a um poder de N. O cenário tecnológico é consistente com os estudos latino-americanos, concluindo que, apesar da dinâmica crescente, há um baixo desenvolvimento da tecnologia no setor.

INTRODUCTION

Scientometric studies quantitatively the performance of researchers, groups, institutions and countries [1,2]. It is a discipline that is complemented by bibliometry to evaluate the dynamics of bibliographic data associated with publications, such as quantity, citations, year of publication, country of origin and authors, among others [3,4,5]. This methodological approach analyses the technical and scientific production of Biotechnology, understood as the scientific and technological application to living organisms, their parts, products and models intended to modify living organisms and/or materials applied to the production of knowledge, goods and services [6,7].

The study is carried out through the analysis of data from scientific production and patents. In this sense, its main contribution is that it complements the available literature reviews, with a bibliometric and technological outlook [8], it provides a picture of the state-of-the-art of a specific technology to discover new trends in patents [9,10], in order to accomplish a more comprehensive vision of the field. It establishes trends, gaps and fields of low bibliometric count [11, 12].

At the macro level, previous work can be referenced from the United Kingdom, the Netherlands and China, which carry out bibliometric studies on science and technology indicators, in order to address their management policies [13,14]. On the meso level, as expressed by Gaillard [15,16], the importance of such studies has been reflected in the characterization of the construction of external networks of scientific collaboration [17,18]. These meso indicators are increasingly important due to their relationship with the capacities that are translated into productivity and project execution [19,20]. Finally, at the micro level, there are works that evaluate the academic quality, productivity and potential of an institution [21], faculty [22], researcher, research group, journal or knowledge area [23]. It is possible to cite the contribution of Glänze et al [24], with a large study of Biotechnology as a domain, although, it does not focus on the agricultural and agro-industrial sectors.

It is worth noting that bibliometric and scientometric analyses have been carried out in Biotechnology to monitor the progress of a country's knowledge and research capacity [25, 26, 27], also the application of these methods to analyze patterns of collaboration in the area has been carried out [28,29]. However, to the best of the author's knowledge, to date, there is no significant work that similarly combines the two techniques focusing on the agricultural and agro-industrial sectors, thus providing a comprehensive picture of the field, which does not only identify aspects related to scientific production, but also manages to incorporate aspects related to the technological development of the area.

In terms of social relevance, a complete characterization of the field is achieved, which is relevant to Biotechnology stakeholders due its close link to global challenges such as climate change, energy security [30,31], and food security [32,33].

The objective of the study is to identify the trends of scientific and technological research in the area, measured through two techniques, which involve the analysis of data related to publications and patenting.

METHOD

An exploratory and descriptive analysis is presented, through a bibliometric analysis and a study of the technological outlook. Analysis unit: Scientific research and innovation products resulting of new knowledge activities and Patents.

Data

6412 scientific articles indexed in Scopus, classified according to the Colciencias model [34] and 16370 technological products according to international patent repositories (European Patent Office and Superintendency of Industry and Commerce of Colombia- SIC). Scopus is used as a database of scientific publications. The Orbit platform is used for the technological outlook.

Scope

For the bibliometric study, the period of time considered was 1952 to 2019. For the technological outlook the range was 1998 to 2019. For both studies the search string used was ("Biotechnology" OR "biotech") AND ("Agro-industry" OR "Agricultur?" OR "Agrarian science").

Inclusion criteria

Scientific articles indexed in Scopus in the field of Biotechnology in the agricultural and agro-industrial sector. Filters were planned in to the technology outlook to include only those items of the agricultural and agro-industrial theme in Biotechnology, as patents, accessible to 2019 on the Orbit Questel platform and at the Superintendency of Industry and Commerce in Colombia

Exclusion criteria

Grey literature, not available in Scopus and with different meanings or contexts.

Characterization of the field

The contribution of Glänze *et al.* [24] is used: (i) plant sciences, (ii) biochemical research methods, (iii) biochemistry & molecular biology (iv) biophysics, (v) biotechnology & applied microbiology, (vi) microbiology, (vii) cell biology, (viii) genetics & heredity and (ix) developmental biology. Subsequently, Boolean chains filters were used to extract only the data corresponding to the agricultural and agro-industrial sectors, using as a criterion a thematic sub-composition, of the agricultural sciences in: (i) agro-Livestock Sciences, (ii) forest sciences, (iii) forestry and (iv) aquaculture and other agricultural sciences in: (i) food agroindustry, (ii) non-food agroindustry and (iii) biotechnology. The environment was considered generic to both sectors.

Search string

It was set in english, considering for the bibliometric study: the coverage of synonyms and acronyms, capture through the title (T), abstract (A), and keywords (K). Some elements were excluded with the use of "and", "or" and truncation symbol *. The following variables were collected: (i) journal title; (ii) year; (iii) surnames and initials of the authors; (iv) country; (v) language of publication, and (vi) type.

RESULTS

Bibliometric Study Results

Authors Records. Of the 14367 authors found, 86,64% registered a single biotechnology publication in the agricultural and industrial sector, the 12,56% between 2 and 5, the 0,60% between 6, the 10, 0,17% between 11 and 20, and the 0,03% more than 20 (see table 1).

Table 1. Author's productivity .

Number of papers	Authors	Articles
1	12447 (86,64%)	12447 (69,47%)
2 - 5	1804 (12,56%)	4371 (24,39%)
6 - 10	86 (0,60%)	630 (3,52%)
11 - 20	25 (0,17%)	337 (1,88%)
> 20	5 (0,03%)	133 (0,74%)
	14367	17918

Among the most representative authors, it is possible to refer to: Miller, H.I, from the Pacific Research Institute, San Francisco, United States with 38 products and an H index of 12 , followed by Fox, J.L from the University of Maryland, United States with 27 products and an H-index of 13, Zilberman, from the University of California, Berkeley, United States with 27 products and an H-index of 47, and Brookes, G. from the PG Economics Ltd, of United Kingdom with 20 items and an H index of 18.

The most cited articles, with the respective citations in the area are:

- Inhibition of anaerobic digestion process: A review [35]: 2386.
- Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance [36]: 1794.
- Map kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity [37]:1618.
- Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis [38]:1333.
- Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review, [39]:1227.
- Hemicellulose bioconversion [40]: 13.
- Cloned transgenic calves produced from no quiescent fetal fibroblasts [41]:1062.
- Potential commercial applications of microbial surfactants [42]:1024.
- Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today [43]:971.
- Antibiotics and antibiotic resistance in water environments [44]: 941.

Figure 1 shows the percentage of authors who have published between 1 and 10 articles. The continuous line graph is obtained from the data of this study, and the dotted in-line plot is a square minimum adjustment to the Lotka Law [45], see Equation 1.

$$a = \frac{C}{p^n} \quad (\text{Ec. 1})$$

Being the percentage of authors who produced of articles. The values obtained for the constants and were 0,8388 and 3.2616 respectively ($r = -0,99$, $p < 0,001$).

Language Participation in Scientific Production. English was found as predominant with the 94,6%, followed by French with 2,2%, and Spanish with 0,7%.

Countries Share. As shown in figure 2, the greatest influence is the United States with 25,6%, followed by India with 9,2%, the United Kingdom with 7,8% and China with 5,7%.

The overall dynamic of production in this field of knowledge is shown in Figure 3. Growth is evident after 1999 and it presents two peaks; one in 2012 with 352 articles and another in 2017 with 366. In 2006, a sharp decline was observed, but then a remarkable recovery was seen until 2012.

Figure 1. Least squares adjustment between the data obtained in the study and the Lotka Law.

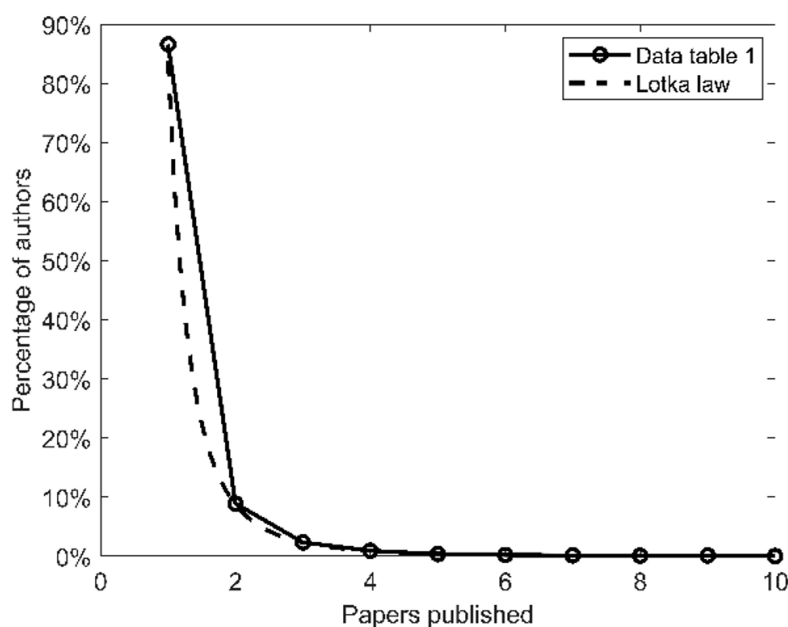


Figure 2. Country share in scientific production [46].



International Journals Participation. The 17918 Scopus articles are distributed in about 147 journals.

The 10 journals with the highest percentage of publications are: Applied Microbiology and Biotechnology (4,4%), Biofutur (3,4%), Bioresource Technology (2,4%), Biotechnology Advances (2%), Current Opinion in Biotechnology (1,7%), International Journal of Biotechnology (1,6%), Nature (1,3%), Nature Biotechnology (1,1%), Science (1%) and Trends in Biotechnology (1%).

Results of the Technologic Outlook

To obtain the results, the tool provided by Orbit Questel was used, in two scopes, international and national, described below.

Results of The International Technology Outlook

Dynamics. In conducting the study in an international field, as shown in Figure 4, it was found that the first inventions related to the area of study, evidenced through patent applications, date back to 1999. Between that year and 2007 the technological performance was in the emerging stage, from there to the present it can be said that the technology is in the stage of growth.

Figure 3. Dynamics of the scientific production. [46]

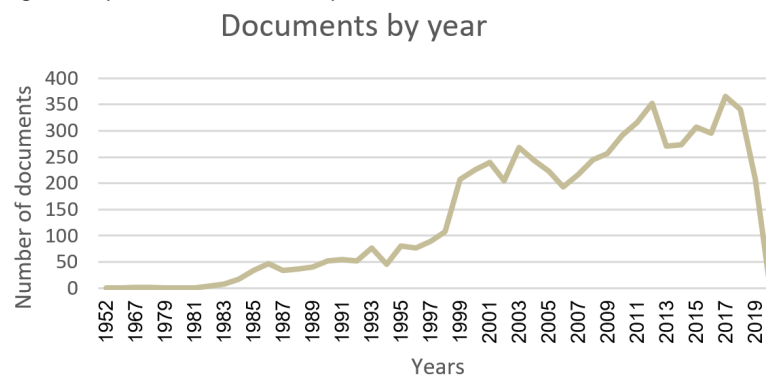
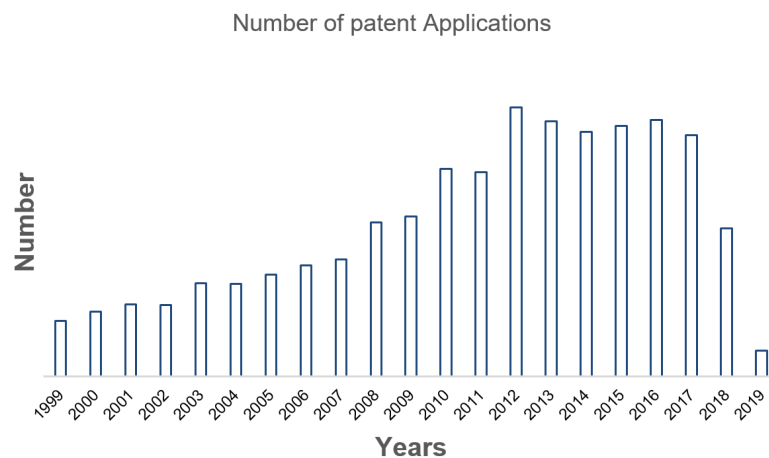


Figure 4. Evolution of the International Patent publications. Source: Orbit Questel.



Technological leadership by countries in the international context. The United States has 7595 inventions and 5729 patents on the subject, China 5687 inventions and 5413 patents, South Korea 904 inventions and 1434 patents and the European Patent Office 732 inventions and 2133 patents.

Technological leadership by organizations in the international context

The main proponents are: Monsanto with 3102 patent applications, followed by Dupont Pioneer with 1618, BASF with 1378, The Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences with 1314, Syngenta with 752, The University of California with 703, Bayer with 683, Dow Agrosiences with 657 and Novozymes with 623.

International Patent Codification-IPC of the field. The main IPC codes found are:

C12N: Biocides, fertilizers, propagation, cultivation or conservation of microorganisms; A01H: New plants or processes to obtain them; plant reproduction by tissue obtaining techniques; C12Q: Measurement or testing processes with enzymes, nucleic acids or microorganisms; C07K: Genetic engineering processes to obtain peptides; C12P: Fermentation processes or processes that use enzymes for the synthesis of a chemical compound; A01N: Conservation of human or animal bodies or plants or their parts; G01N: Investigate or analyze materials by determining their chemical or physical properties; C12M: Facilities for fermenting manure, preservation of live parts of humans or animals; brewing and fermentation apparatus for wine; vinegar-making apparatus; C07H: Processes for the preparation of sugar derivatives based on the Genetic Engineer with DNA or RNA; C05F: Waste or waste fertilizers, i.e. organic fertilizers; C02F: Treatment of water, wastewater or sludge (processes to reduce harmful effects); A23K: Animal feed specially adapted for animals; Methods adapted for production.

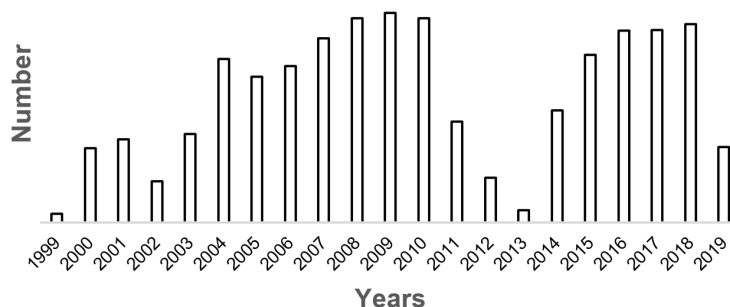
Technology outlook in the national context

National Technologic Dynamic. Figure 5 shows patent applications for Biotechnology in the agricultural and agro-industrial sectors. This dynamic began in 1999 in Colombia, and it shows greater consistency in 2004 and an increase in 2018.

National technological leadership by countries. In patent application by country in Colombia, there are: United States with 1243 applications, Germany with 748, Japan with 259, Switzerland with 228, United Kingdom with 116, France with 65, Israel with 56 and Netherlands with 42.

National technological leadership by organizations. The main applicants are BASF SE with 2995 applications, Bayer AG with 559, Dow Agrosiences LLC with 353, Syngenta Limited with 200, Monsanto Technology with

Figure 5. Number of Patent Applications in SIC.
Number of patent applications



64, Sumitomo Chemical with 64, Ishihara Sangyo Kaisha with 41, Fmccorporation with 39, Wyethllc with 36, Dupont Corporation with 31, Boehringer Ingelheim with 21 and Novartis Ag with 24.

It was found a technological trend for the country directed towards Biocides, herbicides, pesticides, and fertilizers regulating pests for plant growth, genetically modified varieties and technologies for obtaining plants through tissue cultivation. The inventive activity of Colombian organizations such as the Eafit University, Colombian Agricultural Research Corporation- Agrosavia, University of Antioquia and the Universidad del Norte Foundation.

This study analyzed bibliometric indicators such as authors' productivity, transitorily and growth. According to Lotka's bibliometric law, the number of authors with few articles, i.e. from 1 to 2, is greater than that of those who publish many articles. As expressed by Lotka It can be said that in this distribution 4 levels of productivity are obtained: level 1 small (1), medium level 2 (2-9), level 3 large (10-19) and maximum producers (more than 20 papers) [47,48].

The scientific production indicators on studies in the area of Biotechnology at the global level, have reported significant growths [49]. The results obtained in this study with respect to this dynamic, which would be expected to be reflected later in disciplinary development, showed a post-1999 growth trend and two peaks or hikes; one in 2012 and one in 2017. The production in this sector in Latin America has grown in recent years, however, the gap between developing and developed countries is evident, since Latin America has limited technological capabilities, in this sense, the production of patents in Latin America is lower, which leads to analyze their trend and look for strategies to promote technological innovation [50].

Regarding the results obtained with respect to the most technology-supporting countries in the field, The most representative was the United States, followed by India, the United Kingdom and China with much smaller shares. This is reflected in the fact that the economy of these developed countries depends on technology, while developing countries depend on natural resources [10]. For developing countries to strengthen their industries, they must develop plans and policies, and invest in capacity to deploy biotechnology advances across their value chain [51].

Referring to the dynamics of these patents in Colombia, initiated, most forcefully in 2004, presenting the peak of the greatest representativeness in 2018, it can be commented, that the studies undertaken by the Argentine Center for Scientific and Technological Information (CAICYTCONICET) and described by Barrere [52], demonstrate that the technological development measured through patents is very poor for the Ibero-American region when compared to the main countries of the world. According to the author, the growth of this period was precisely due to an international expansion in the field of Biotechnology that influenced the development of Ibero-America.

To comment on the weak technological leadership of organizations, where patents applications in the national territory are mostly granted to international organizations, according to Barrere [52], in the referenced development, the presence of organizations is below the individual inventors. At the Ibero-América level this trend is based on the weakness of a strong business network that enhances patenting, linked to a relative strength or tendency to train researchers and technologists. In this sense, Colombia is not representative, giving the first places to Argentina, Chile, Brazil and Mexico. In the case of the agricultural sector, this analysis at the Ibero-America level reports that patents related to genetically modified organisms predominate and correspond to the authorship of multinational companies and not to R&D-funded activities in the countries where they have been awarded. It should be noted that within patent applicant organizations, some of the academic sector were found, which supports Barrere's statements [52].

CONCLUSIONS

The focus of this study was the quantitative analysis and research and technological trends in the area of Biotechnology in agriculture and agro-industry. Despite international comparisons, the current study indicated a notable increase in the number of publications and patents at the international level in recent years, because,

in the agricultural and agricultural sector, biotechnology has played an important role in sustainability of production [53], through the development of technologies that promote conserving soil characteristics, increasing crop productivity and increasing pest resistance [54].

Colombia is considered as a potential market for countries such as the United States, Germany, Japan, Switzerland and the United Kingdom, as well as for companies such as Bayer Ag that markets sanitary and agricultural products [55], Dow Agrosience offering products such as insecticides, herbicides, fumigants and other chemicals, Syngenta AG that produces herbicides, insecticides, fungicides and seeds for field crops, vegetables and flowers Sumitomo Chemical Co Ltd that offers chemicals, petrochemicals and fine chemicals, intermediate pharmaceuticals and agrochemicals and Monsanto offering seeds, herbicides and technologies related to the field [55]

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Universidad del Cauca (501100005682) under Grant (5038)

REFERENCES

- [1] BURMAOGLU, SERHAT; SARITAS, OZCAN; KIDAK, LEVENT-BEKIR; BERBER, IPEK-CAMUZ. Evolution of connected health: a network perspective. *Scientometrics*, v. 112, n. 3, 2017, p. 1419-1438. 10.1007/s11192-017-2431-x
- [2] RUIZ-ROSETO, JUAN; RAMIREZ-GONZALEZ, GUSTAVO; VIVEROS-DELGADO, JESÚS. Software survey: ScientoPy, a scientometric tool for topics. *Scientometrics*, v. 121, n. 2, 2019, p. 1165-1188. 10.1007/s11192-019-03213-w
- [3] EKER, SIBEL; ROVENSKEYA, ELENA; LANGAN, SIMON; OBERSTEINER, MICHAEL. Model validation: A bibliometric analysis of the literature. *Environmental Modelling and Software*, v. 117, n. 1, 2019, p. 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2019.03.009>
- [4] HALLINGER, PHILIP; KOVAČEVIĆ, JAASNA. A bibliometric review of research on Educational Administration: Science Mapping the Literature 1960 to 2018. *Review of Educational Research*, v. 89, n. 1, 2019, p. 335-369. <https://doi.org/10.3102/0034654319830380>
- [5] EKER, SIBEL; ROVENSKEYA, ELENA; LANGAN, SIMON; OBERSTEINER, MICHAEL. Model validation: A bibliometric analysis of the literature. *Environmental Modelling & Software*, v. 117, n. 1, 2019, p. 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2019.03.009>
- [6] FRANCE. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. The OECD Glossary of Statistical Terms [online]. 2019. Available: <https://stats.oecd.org/glossary/about.asp>. [Citado 17 de Diciembre de 2019]
- [7] WIDIANTO-ATMOJO, IDAM-RAGIL; SAJIDAN, M.R.; SUNARNO, WIDHA; ASHADI, A.; NUGRAHA, DEWANTA-ARYA. The profiles of pre-service elementary teachers (PETs) in biotechnology using RCB. *AIP Conference Proceedings*, v. 2014, n. 1, 2018, p. 1-7. 10.1063/1.5054467
- [8] SHARMA, P.; TRIPATHI, R.C. Patent citation: A technique for measuring the knowledge flow of information and innovation. *World Patent Information*, v. 51, n. 1, 2017, p. 31-42. 10.1016/j.wpi.2017.11.002
- [9] RIBEIRO, BARBARA; SHAPIRA, PHILIP. Private and public values of innovation: A patent analysis of synthetic biology. *Research Policy*, v. 49, n. 1, 2020, p. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2019.103875>
- [10] BELLO, SHUKURAT M.; VINCENT, MAMUDU-EJIGA; PATRICK, IDAKWO; FARIDA, OJI. Human Capital and the Growth of Biotechnology in Developing Countries. *East African Scholars Journal of Biotechnology and Genetics*, v. 1, n. 3, 2019, p. 1-6.

- [11] BRUNS, STEPHAN B; STERN, DAVID I. Research assessment using early citation information. *Scientometrics*, v. 108, n. 2, 2016, p. 917-935.
- [12] HAMMARFELT, B. What is a discipline? The conceptualization of research areas and their operationalization in bibliometric research. n 23rd International Conference on Science and Technology Indicators. Leiden (Netherlands): Centre for Science and Technology Studies (CWTS), 2018, p. 197-203.
- [13] SHU, FEI; JULIEN, CHARLES-ANTOINE; LARIVIÈRE, VINCENT. Does the web of science accurately represent chinese scientific performance?. *Journal of the Association for Information Science and Technology*, v. 10, n. 1, 2019, p. 1138-1152.
- [14] OANCEA, ALIS. Research governance and the future(s) of research assessment. *Palgrave Commun*, v. 5, n. 27, 2019, p. 1-11.
<https://doi.org/10.1080/14682753.2015.1041803>
- [15] GAILLARD, ANNE-MARIE; GAILLARD, JACQUES; RIGAS, ARVANITIS. Cooperación, colaboración científica, y movilidad internacional en América Latina. 1 ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina): Clacso, 2014, 284 p.
- [16] PAZ-LOPEZ, MARÍA. La cooperación en ciencia y tecnología entre Argentina y los países de América Latina. El caso del Centro Argentino-Cubano de Biotecnología Aplicada al Desarrollo de Vacunas y Fármacos. *Cuadernos de Política Exterior Argentina*, v. 19, n. 1, 2017, p. 139-164.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0719-09482019000100139>
- [17] LOTRECCHIANO, GAETANO R; MALLINSON, TRUDY R.; LEBLANC-BEAUDOIN, TOMMY; SCHWARTZ, LISA S.; LAZAR, DANIELLE; FALK-KRZESINSKI, HOLLY J. Individual motivation and threat indicators of collaboration readiness in scientific knowledge producing teams: a scoping review and domain analysis. *Heliyon*, v. 5, n. 1, 2016, p. 1-51.
[10.1016/j.heliyon.2016.e00105](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00105)
- [18] COSTA-RIBEIRO, LEONARDO; SIQUEIRA-RAPINI, MÁRCIA; ALVES-SILVA, LEANDRO; MOTTA-ALBUQUERQUE, EDUARDO. Growth patterns of the network of international collaboration in science. *Scientometrics*, v. 114, n. 1, p. 159-179.
<https://doi.org/10.1007/s11192-017-2573-x>
- [19] GASSON, SUSAN C.; BRUCE, CHRISTINE. Supporting higher degree research collaboration. *Studies in Graduate and Postdoctoral Education*, v. 10, n. 3, 2019, p. 189-199.
<https://doi.org/10.1108/SGPE-04-2019-0040>
- [20] ASHRAF-WANI, ZAHID; ZAINAB, TAZEEM. Scholarly Content and Its Evolution by Scientometric Indicators: Emerging Research and Opportunities: Emerging Research and Opportunities. 1 ed. Pennsylvania (USA): IGI GLOBAL, 2018, 201 p.
- [21] BATCHA, SADIK. Research Output Analysis of Top Six Universities of Tamil Nadu, India: A Scientometric View. *Journal of Library & Information Technology*, v. 28, n. 1, 2018, p. 11-20.
- [22] KWIEK, MAREK. Social stratification in Higher Education: What it means at the micro-level of the individual academic scientist. *Higher Education Quarterly*, v. 73, n. 4, 2019, p. 419-444.
[10.1111/hequ.12221](https://doi.org/10.1111/hequ.12221)
- [23] GUTIÉRREZ-SALCEDO, M.; ÁNGELES-MARTÍNEZ, M.; MORAL-MUNOZ, J.A.; HERRERA-VIDEIRA, E.; COBO, M.J. Some bibliometric procedures for analyzing and evaluating research fields. *Applied Intelligence*, v. 48, n. 5, 2018, p. 1275-1287.
[10.1007/s10489-017-1105-y](https://doi.org/10.1007/s10489-017-1105-y)
- [24] GLÄNZEL, W.; MEYER, B.; SCHLEMMER, B.; DU PLESSIS, B.; THIJS, B.; MAGERMAN, T.; DEBACKERE, K.; VEUGELERS, R. Domain Study "Biotechnology" - An Analysis based on Publications and Patents. *Steunpunt O&O Statistiek*, v. 1, n. 1, 2003, p. 1-69.
- [25] BAJWA, R.S.; YALDRAM, K. Bibliometric analysis of biotechnology research in Pakistan. *Scientometrics*, v. 95, n. 2, 2013, p. 529-540.
<https://doi.org/10.1007/s11192-012-0839-x>
- [26] MARTÍNEZ, H.; JAIME, A.; CAMACHO, J. Biotechnology profile analysis in Colombia. *Scientometrics*, v. 101, n. 3, 2014, p. 1789-1804.
<https://doi.org/10.1007/s11192-014-1408-2>

- [27] EVANGELATOS, NIKOLAOS; SATYAMOORTHY, KAPAETTU; LEVIDOU, GEORGIA; BAUER, PIA; BRAND, HELMUT; KOUSKOUTI, CHRISTINA; LEHRACH, HANS; BRAND, ANGELA. Multi-Omics Research Trends in Sepsis: A Bibliometric, Comparative Analysis Between the United States, the European Union 28 Member States, and China. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, v. 22, n. 3, 2018, p. 190-197. doi: 10.1089/omi.2017.0192
- [28] GOMES-COSTA, BENEDITA-MARTA; DA SILVA-PEDRO, EDILSON; RIBEIRO-DE MACEDO, GORETE. Scientific collaboration in biotechnology: The case of the northeast region in Brazil. *Scientometrics*, v. 95, n. 2, 2013, p. 571-592. <https://doi.org/10.1007/s11192-012-0924-1>
- [29] GONÇALVES-PEREIRA, CRISTIANO; RIBEIRO-DA SILVA, RODRIGO; LAVOIE, JOAO; GECIANE, PORTO. Technological cooperation network in biotechnology Analysis of patents with Brazil as the priority country. *Innovation & Management Review*, v. 15, n. 1, 2018, p. 416-434.
- [30] ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Future Prospects for Industrial Biotechnology*. 1 ed. New York (USA): OECD Publishing, 2011, 140 p.
- [31] MOHAN, V.; MOHIUDDIN, M.; AHUJA, Y. In *Applied Molecular Biotechnology: The Next Generation of Genetic Engineering*, *Applied Molecular Biotechnology: The Next Generation of Genetic Engineering Environmental biotechnology: Approaches for ecosystem conservation*. 1 ed. Boca Raton (USA): CRC Press, 2016, pp. 529-554.
- [32] PÉREZ-VÁZQUEZ, ARTURO; LEYVA-TRINIDAD, DORIS-ARIANNA; GÓMEZ-MERINO, FERNANDO CARLOS. Desafíos y propuestas para lograr la seguridad alimentaria hacia el año 2050. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, v. 9, n. 1, 2018, p. 175-189. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i1.857>
- [33] BUGGE, MARKUS; HANSEN, TEIS; KLITKOU, ANTJE. "What is the Bioeconomy? A Review of the Literature. *Sustainability*, v. 8, n. 7, 2016, p. 1-23. <https://doi.org/10.3390/su8070691>
- [34] COLOMBIA. DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (COL-CIENCIAS). *Modelo de Medición de Grupos de Investigación, Desarrollo Tecnológico o de Innovación y de Reconocimiento de Investigadores del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación*. 1 ed. Bogotá (Colombia): COLCIENCIAS, 2017, p. 198.
- [35] CHEN, YE; CHENG, JAY J.; CREAMER, KURT S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Biore-source Technology*, v. 99, n. 10, 2008, p. 4044-4064. 10.1016/j.biortech.2007.01.057
- [36] WANG, WANGXIA; VINOCUR, BASIA; ALTMAN, ARIE. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, n. 1, 2003, p. 1-14. 10.1007/s00425-003-1105-5
- [37] ASAI, TSUNEAKI; TENA, GUILLAUME; PLOTNIKOVA, JOULIA; WILLMANN, MATTHEW; CHIU, WAN-LING; GOMEZ-GOMEZ, LOURDES; BOLLER, THOMAS; AUSUBEL, FREDERICK; SHEEN, JEN. Map kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, v. 415, n. 6875, 2002, p. 977-983. <https://doi.org/10.1038/415977a>
- [38] APSE, M.P.; AHARON, G.S.; SNEDDEN, W.A.; BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis. *Science*, v. 415, n. 6875, p. 977-983. 10.1126/science.285.5431.1256
- [39] AHMAD, MAHTAB; RAJAPAKSHA, ANUSHKA-UPAMALI; LIM, JUNG-EUN; ZHANG, MING; BOLAN, NANTHI; MOHAN, DINESH; VITHANAGE, METHTHIKA; LEE, SANG-SOO; OK, YONG-SIK. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, v. 99, n. 1, 2014, p. 19-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.071>
- [40] SAHA, BADAL. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 5, 2003, p. 279-291. 10.1007/s10295-003-0049-x

- [41] CIBELLI, JOSE B.; STICE, STEVE L.; GOLUEKE, PAUL J.; KANE, JEFF J.; JERRY, JOSEPH; BLACKWELL, CATHY; PONCE-DE LEÓN, ABEL; ROBL, JAMES. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, v. 280, n. 5367, 1998, p. 1256-1258.
10.1126/science.280.5367.1256
- [42] BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 5, 2000, p. 495-508.
- [43] HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 12, 2006, p. 549-556.
10.1016/j.tibtech.2006.10.004
- [44] BAQUERO, FERNANDO; MARTÍNEZ, JOSÉ-LUIS; CANTÓN, RAFAEL. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, 2008, p. 260-265.
10.1016/j.copbio.2008.05.006
- [45] DA SILVA, SERGIO; PERLIN, MARCELO; MATSUSHITA, RAUL; SANTOS, ANDRE A.P.; IMASATO, TAKE-YOSHI; BORENSTEIN, DENIS. Lotka's law for the Brazilian scientific output published in journals. *Journal of Information Science*, v. 45, n. 5, 2019, p. 705-709.
- [46] SCOPUS. [on line]. 2019. Available: <https://www.scopus.com> [Citado 17 de Diciembre de 2019]
- [47] MURUGAN, MANTHIRAMOORTHY; DR, SARAVANAKUMAR; THIRUMAGAL, A.DR. Lotka's Law and Pattern of Author Productivity of Information Literacy Research Output. *Library Philosophy and Practice*, v. 4, n. 1, 2019 p. 1-9.
10.1177/0165551518801813
- [48] BENSMAN, STEPHEN; SMOLINSKY, LAWRENCE. Lotka's inverse square law of scientific productivity: Its methods and statistics. *Computer Science*, v. 68, n. 7, p. 1-12.
- [49] RONDA-PUPO, GUILLERMO-ARMANDO; RONDA-DANTA, YESENIA; LEIVA-PUPO, YUSLEYDIS. Correlation between a country's centrality measures and the impact of research paper: The case of biotechnology research in Latin America. *Investigación Bibliotecológica: Archivonomía, Bibliotecología e Información*, v. 30, n. 69, 2019, p. 73-92.
10.1016/j.ibbai.2016.10.017
- [50] BARRAGÁN-OCAÑA, ALEJANDRO; GÓMEZ-VIQUEZ, HORTENSIA; VIQUEZ-MERRITT, HUMBERTO; OLIVER-ESPINOZA, RUBÉN. Promotion of technological development and determination of biotechnology trends in five selected Latin American countries: An analysis based on PCT patent applications. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 37, n. 1, 2019, p. 41-46.
- [51] LOKKO, YVONNE; HEIJDEB, MARC; SCHEBESTA, KARL; SCHOLTÈSA, PHILIPPE; VAN-MONTAGUB, MARC; GIACCA, MAURO. Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial. *New Biotechnology*, v. 40, n. 1, 2018, p. 5-10.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.005>
- [52] BARRERE, R. La biotecnología en Iberoamérica. Situación actual y tendencias. 1 ed. Buenos Aires (Argentina): Organización de Estados Iberoamericanos-Agencia Española de Cooperación Internacional, 2010, 92 p.
- [53] CANO-ESTRADA, ARACELI; VELEZ-DÍAZ, DANIEL; MORGADO-HERNANDEZ, CARLOS-ALBERTO. The role of biotechnology in agricultural production and food supply. *Ciencia e Investigación Agraria*, v. 44, n. 1, 2017, p. 1-17.
<http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i1.1567>.
- [54] KATNA, GOPAL; SOOD, VINOD-KUMAR. Plant genetic resources, traditional knowledge and their use in crop improvement. *Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security*. 1 ed. London (UK): Earthscan, 2016, 358 p, https://doi.org/10.1007/978-981-10-0060-7_2
- [55] BLOOMBERG [online]. 2019. Available: <https://www.bloomberg.com>. [Citado 17 de Diciembre de 2019]

Evaluación de métodos para la inoculación y diagnóstico del virus del mosaico del pepino (CMV)*

Evaluation of methods for inoculation and diagnosis of the cucumber mosaic virus (CMV)

Avaliação de métodos para inoculação e diagnóstico de vírus de mosaico do pepino (CMV)

SÁNCHEZ, MANUEL-ALEJANDRO¹; VILLEGAS-ESTRADA, BERNARDO²;
VALENCIA-JIMÉNEZ, ARNUBIO³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 21 de Enero 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Proyecto de investigación de origen: "Efectos de la aplicación de secuencias de ARN de cadena doble (ARNcd) en el silenciamiento del virus del mosaico del pepino (CMV)". Financiación: Universidad de Caldas y Minciencias, códigos 0178917 y 1672118. Culminación: Agosto 6 de 2021.

- 1 Universidad del Caldas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Grupo de investigación Ciencias agronómicas y pecuarias (GICAP). Magíster en Ciencias Biológicas. Manizales, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2970-8825>
- 2 Universidad de Caldas, Departamento de producción Agropecuaria, Grupo de Investigación InGene. Magíster en Fitopatología: Manizales, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-4441-5278>
- 3 Universidad de Caldas, Departamento de producción Agropecuaria, Grupo de Investigación InGene. Doctor en Ciencias Biológicas. Manizales, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3328-2932>

Correspondencia: arnubio.valencia@ucaldas.edu.co

RESUMEN

El virus del mosaico del pepino (CMV) es un agente limitante en la producción y calidad de cultivos agrícolas cuya inoculación efectiva y diagnóstico confiable son esenciales para implementar estrategias de manejo adecuadas y oportunas. Se evaluaron dos protocolos para la inoculación del CMV en plantas indicadoras (Nicotiana benthamiana y N. tabacum cv. Xanthi) y diferentes métodos de detección de este virus. La infección de plantas con CMV se logró mediante transmisión mecánica e infiltración. La presencia del virus se confirmó mediante la expresión de síntomas, serología (ImmunoStrip®), RT-PCR y por secuenciación. Los resultados confirmaron la efectividad del método de transmisión mecánica, en el cual, las plantas infectadas presentaron sintomatología asociada con el virus 15 días después de su inoculación. La prueba serológica permitió detectar la presencia del patógeno solo en las plantas de N. benthamiana, mientras que la prueba de RT-PCR en todas las plantas evaluadas. Los resultados de secuenciación mostraron altos valores de identidad nucleotídica con las secuencias reportadas en el NCBI para este virus. La transmisión mecánica fue el método más efectivo para la inoculación del CMV y las técnicas de análisis molecular fueron más sensibles y confiables para su identificación, en comparación con la prueba serológica.

ABSTRACT

The cucumber mosaic virus (CMV) is a limiting agent in the production and quality of agricultural crops whose effective inoculation and reliable diagnosis are essential to implement suitable and timely management strategies. Two protocols for CMV inoculation (Nicotiana benthamiana and N. tabacum cv. Xanthi) as indicator plants and different virus detection methods were evaluated. Infection of plants with CMV was achieved by mechanical transmission and infiltration. The presence of the virus was confirmed by expression of symptoms, serology (ImmunoStrip®), RT-PCR and by sequencing. The results confirmed the effectiveness of the mechanical transmission. The infected plants showed symptoms associated with the pathogen 15 days after inoculation. The serological test allowed detecting the presence of the pathogen only in N. benthamiana plants, while the RT-PCR test in all evaluated plants. The sequencing results showed high nucleotide identity values with the sequences reported in the NCBI for this virus. Mechanical transmission was the most effective method for CMV inoculation, and molecular analysis techniques were more sensitive and reliable for CMV identification, compared to serological test.

RESUMO

O vírus do mosaico do pepino (CMV) é um agente limitante na produção e qualidade das culturas agrícolas cuja inoculação eficaz e diagnóstico confiável

PALABRAS CLAVE:

ImmunoStrip; Enfermedad; Serología.

KEYWORDS:

ImmunoStrip; Disease; Serology.

PALAVRAS-CHAVE:

ImmunoStrip; Doença; Serologia.

Como citar este artículo: SÁNCHEZ, MANUEL-ALEJANDRO; VILLEGAS-ESTRADA, BERNARDO; VALENCIA-JIMÉNEZ, ARNUBIO. Evaluación de métodos para la inoculación y diagnóstico del virus del mosaico del pepino (CMV). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 92-104. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)92-104](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)92-104)

são essenciais para implementar estratégias de manejo adequadas e oportunas. Foram avaliados dois protocolos de inoculação de CMV em plântulas indicadoras (*Nicotiana benthamiana* e *N. tabacum* cv. Xanthi) e diferentes métodos de detecção do vírus. A infecção com CMV foi obtida por transmissão mecânica e por infiltração. A presença do vírus foi confirmada pela expressão dos sintomas, serologia (ImmunoStrip®), RT-PCR e sequenciamento. Os resultados confirmaram a eficácia da transmissão mecânica, no qual plântulas infectadas apresentaram sintomas associados ao vírus 15 dias após a inoculação. O teste serológico permitiu detectar a presença do patógeno apenas nas plantas de *N. benthamiana*, enquanto o teste RT-PCR em todas as plantas avaliadas. Os resultados do sequenciamento mostraram altos valores de identidade de nucleotídeos com as sequências do vírus no NCBI. A transmissão mecânica foi o método mais eficaz para a inoculação do CMV e as técnicas de análise molecular foram mais sensíveis e confiáveis para identificação do CMV, em comparação com os testes serológicos.

INTRODUCCIÓN

Los virus, son los patógenos vegetales más importantes, después de los hongos [1]. Estos agentes biológicos provocan daños en muchos cultivos de interés agrícola [2], generando pérdidas económicas de miles de millones de dólares en todo el mundo [3]. Los cuatro virus vegetales más importantes desde el punto de vista científico y económico son: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYL-CV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV) [4]. En Colombia se reportado la presencia del CMV en herbáceas (plátano, banano) [5], hortalizas (pepino, pimentón) [6], y frutales como lulo [7], entre otros.

El CMV es probablemente uno de los patógenos vegetales más exitosos, ya que puede afectar a más de 1.200 especies de plantas [8]. Este virus es transmitido por los pulgones de manera no persistente [8], los cuales han sido utilizados como vectores para transmitir patógenos virales en condiciones ambientales controladas, sin embargo, su tasa de transmisión es muy baja [9], lo que los hace poco prácticos a gran escala. Por su parte, la transmisión mecánica con savia infectiva, por medio de la inoculación, es la estrategia más utilizada en estudios de virus vegetales [10].

La transmisión mecánica efectiva ocurre si el virus puede replicarse en las células epidérmicas infectadas, y luego moverse a otros tejidos de la planta en donde pueda desarrollar centros infecciosos [11]. Se sabe que el CMV puede transmitirse mecánicamente e infectar plantas de manera eficiente, ya que su genoma codifica proteínas involucradas en el movimiento de célula a célula, así como también movimientos a través de los haces vasculares [12]. El genoma de este virus consta de tres segmentos de ARN monocatenarios de sentido positivo (ARN 1, ARN 2 y ARN 3). El ARN 1 (3,4 kb) y el ARN 2 (2,2 kb) codifican para la expresión de las proteínas 1a y 2a respectivamente, las cuales están involucradas en la replicación y transcripción del virus. El ARN 2 igualmente codifica para la síntesis de la proteína 2b la cual participa en la supresión del silenciamiento genético, y el ARN 3 (3,0 kb) codifica para proteínas de la cápside y del movimiento [13].

Debido a estas propiedades genómicas, el CMV causa un deterioro del estado normal de la planta, modificando o interrumpiendo funciones vitales (germinación transpiración, y fotosíntesis) [14]. Estas alteraciones del desarrollo en la planta a menudo conllevan a síntomas específicos como mosaicos, moteados, distorsión de la estructura de las hojas, y retraso en el crecimiento de las plantas afectadas [12]. Sin embargo, los síntomas pueden confundirse con aquellos causados por estrés biótico (infección por otros patógenos, daños por plagas) o por factores abióticos (condiciones climáticas desfavorables, desequilibrios nutricionales) [15]. Por lo tanto, un diagnóstico preciso y eficiente de este virus en etapas tempranas de la enfermedad representa una tarea importante y necesaria a la hora de implementar un manejo eficiente [16].

Actualmente, existen diferentes métodos orientados a la detección de virus, los cuales se basan en el empleo de microscopía electrónica, en técnicas serológicas y en enfoques moleculares. La microscopía electrónica es limitante debido a que solo determina la morfología de la partícula viral [17], las técnicas serológicas tienen una sensibilidad limitada, lo cual genera posibles inconvenientes a la hora de hacer la detección viral [18], y las técnicas moleculares, por su parte, permiten una detección más eficiente y sensible, superando las limitaciones de

las técnicas tradicionales y serológicas [19]. Sin embargo, este último tipo de análisis depende, en gran medida, de la calidad del ARN extraído, lo cual puede eventualmente limitar su uso [20].

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar, bajo condiciones controladas, la efectividad de dos métodos de inoculación del CMV en plantas indicadoras, y tres técnicas de diagnóstico.

MÉTODO

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad de Caldas, en la ciudad de Manizales-Caldas, ubicado a una altitud de 2.153 msnm y cuyas condiciones ambientales promedio son temperatura de 19°C y humedad relativa de 80%.

Las semillas de plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* L. cv Xanthi fueron proporcionadas por el Dr. Sadao Kobayashi del Centro de Investigación Tibaitatá (Agrosavia), y la cepa viral del CMV proporcionada por el Dr. Wilmer Cuellar, director de la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT (Palmira-Valle del Cauca). Las plantas indicadoras crecieron en una cámara de ambiente semi-controlado cuyo rango de temperatura fue de 22 a 26°C, humedad relativa de 60 a 80% y fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad). La siembra y establecimiento del material vegetal de ambas especies consistió en una etapa de pre-germinación de las semillas sumergidas en agua, en condiciones de luz constante durante tres días. Como sustrato se empleó una mezcla de arena y tierra estériles en proporción 1:2.

Inoculación del CMV

El inóculo del CMV fue preparado a partir de una muestra liofilizada de material vegetal infectado, del cual se tomó 0,1 g de tejido y se maceró con 1,5 mL de agua destilada estéril con la ayuda de un mortero mantenido a 4°C.

Para los tratamientos se evaluaron 24 plantas indicadoras de ocho semanas de edad (12 de *N. benthamiana* y 12 de *N. tabacum*) e igual número de plantas para el control. La inoculación del CMV se realizó sobre hojas con un diámetro comprendido entre 1,5 y 3,0 cm, empleando dos procedimientos. El primero fue la transmisión mecánica frotando suavemente la savia con la ayuda del dedo índice sobre las hojas de las plantas indicadoras. El segundo fue mediante infiltración, realizando una punción en la vena principal de la hoja cerca de su ápice; luego, en el lugar de la punción se inyectaron 0,1 mL de la savia infectada con el virus usando una jeringa sin aguja de 1 mL de capacidad. Las plantas control se inocularon con agua destilada estéril siguiendo el mismo procedimiento. En todos los casos, se emplearon seis repeticiones biológicas (unidades experimentales) por cada método de inoculación y por cada especie, en un diseño completamente al azar. Para determinar el grado de saturación de las hojas inoculadas con el extracto se llevó a cabo una infiltración con una solución al 1% de rojo congo o calcofluor, con volúmenes entre 0,1 y 0,5 mL (datos no mostrados).

Detección del CMV en las plantas inoculadas

La efectividad de las vías de inoculación del CMV se evaluó mediante observación de la sintomatología en las plantas, por pruebas serológicas (ImmunoStrip®) y mediante el empleo de análisis molecular (RT-PCR y secuenciación). Los procedimientos se describen a continuación:

Sintomatología

Se evaluaron los síntomas en hojas y el desarrollo general de la planta. Los síntomas se registraron a los 3, 15 y 21 días después de la inoculación (ddi). En la figura 1 se observa la escala de síntomas propuesta para la evaluación del CMV.

Figura 1. Escala de síntomas para la virosis del CMV en hojas de *N. benthamiana*.



A. Grado 0= Hoja aparentemente sana. B. Grado 1= Hoja con mosaico leve, sin arrugamiento. C. Grado 2= Hoja con mosaico leve o deformación. D. Grado 3= Hoja con deformación y/o mosaicos moderados. E. Grado 4= Hoja con mosaico y/o deformación severa.

Serología

Esta prueba se realizó diez días después de la inoculación en cada una de las repeticiones biológicas. Para esto se utilizó el kit ImmunoStrip® para CMV (Agdia Inc., Elkhart, IN), colocando 0,1 g de la muestra vegetal en una bolsa con tampón de extracción, siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

Moleculares

La detección molecular del virus se efectuó por RT-PCR y por secuenciamiento como prueba confirmatoria de los resultados de sintomatología y serología. De *N. benthamiana*, se tomó una y de *N. tabacum* dos plantas para los análisis moleculares a los 25 días después de realizada la inoculación; las cuales se codificaron así: P1 (*N. benthamiana*), P2 y P3 (*N. tabacum*).

RT-PCR

Se extrajo ARN total, utilizando el kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA). De las muestras P1, P2 y P3 se maceraron 0,1 g de tejido foliar con sintomatología viral en 1 mL de buffer de lisis conteniendo 10 µL de β-mercaptoetanol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar el procedimiento, el ARN total obtenido fue eluido con 30 µL de agua estéril libre de ARNasas. El producto obtenido se visualizó en gel de agarosa al 1% y se cuantificó con la ayuda de un nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). La síntesis de ADNc se realizó empleando el kit Maxima H Minus First Strand cDNA (Thermo Scientific) siguiendo un método de dos etapas. En la primera etapa, se usó 1 µg de ARN total de cada muestra, 1 µL (dT) primer, 1 µL de dNasa, 1 µL de dNTPmix (10 mM), y posteriormente el volumen se aforó a 10 µL con agua libre de nucleasas, y el volumen final se dejó a temperatura de 65°C por 5 minutos en un termociclador C1000 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA). En la segunda etapa se añadieron 4 µL de buffer (5x) y 1 µL de enzima máxima H. Las muestras se sometieron finalmente a 50°C durante 30 min y después a 85°C por 5 min para la reacción. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C.

La RT-PCR se realizó con 2 µL de una dilución 1:50 de ADNc, en un volumen final de reacción de 10 µL, el cual incluyó 5 µL de Master-mix (Catálogo No. AB-0575; Thermo Scientific) (solución tampón, MgCl₂, dNTP y Taq polimerasa), 0,5 µL de cebadores (10 µM) (sentido y antisentido), y 2,5 µL de agua libre de nucleasas. Finalmente, esta mezcla se llevó a termociclador a 95°C durante 5 min, seguidos 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C durante 1 min con 36 ciclos, con una extensión final de 72°C durante 10 min. Los cebadores empleados en la RT-PCR se diseñaron con la ayuda de la herramienta bioinformática Oligoperfect Primer designer (www.thermofisher.com/), cinco juegos de cebadores (Cuadro 1), uno por cada gen del CMV, fueron enviados a Invitrogen (www.thermofisher.com) para su síntesis.

Cuadro 1. Cebadores para amplificación por RT-PCR de los genes del CMV.

Nombre del cebador	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del amplicon (bp)	Gen objetivo
M1	F: GCGTTATCCACGCTGGTATT R: AAATCCGCACTGTTTCCAC	165	Replicación (ORF1a/ARN1)
M2	F: CAAAAGTCCCAGCGAGAGAG R: GGCGAACCAATCTGTATCGT	190	Transcripción (ORF2a/ARN2)
M3	F: TGGATGTCAGCGAGAGTGTC R: ATACGCATGGGTTTGACCAT	172	Supresión de silenciamiento (ORF2b/ARN2)
M4	F: AATCGTAAGCGGTGTTTGC R: AGCTGACGGTTTTGTTGCT	170	Proteína de movimiento (ORF3a/ARN3)
RNA3ORF3aSeq2	F:AATCGTAAGCGGTGTTTGC R: TGACGGTTTTGTTGCTCAG	189	Proteína de Movimiento
M5	F: AACCAGTGCTGGTCGTAACC R: GCGTTCACCTCCCTACAAAGG	189	Proteína de cápside (ORF3b/ARN3)

Los fragmentos amplificados se llevaron a cámara de electroforesis (Horizon® 58) en geles de agarosa al 1% en tampón TAE pH 8. La visualización de los productos se efectuó empleando GelRed® (Cat.No.41010. Biotium) en relación 1:1. Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA Ladder-1kb (Promega) (Cat.No.M102R GenScript). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V por 30 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron con la ayuda de un Transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR (BIO-RAD).

Los amplicones del tamaño esperado se purificaron con el kit ExoSAP-IT™ (Cat.No.78200. Applied Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras (P1, P2 y P3) para secuenciamiento se prepararon incluyendo el cebador M4 antisentido y se enviaron a Eurofins Scientific (Des Moines, IA, USA). Las secuencias obtenidas se verificaron y editaron manualmente utilizando el software Finch TV_1_4_0 construyéndose secuencias consenso y confirmando su identidad por comparación con los datos depositados en el GenBank del NCBI, mediante BLAST.

RESULTADOS

Métodos de detección del CMV

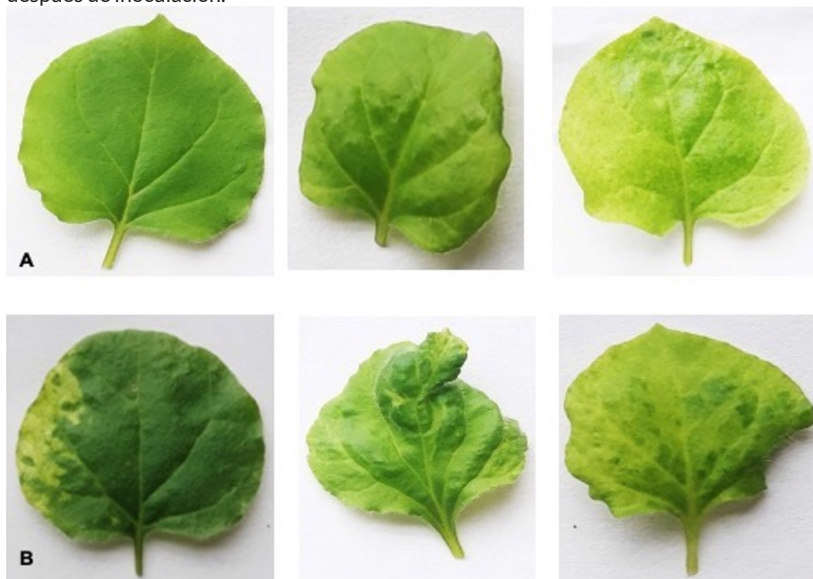
Detección viral por sintomatología

En plantas de *N. benthamiana* inoculadas mediante transmisión mecánica se observó corrugamiento leve, mientras que las plantas inoculadas por infiltración presentaban encogimiento de la hoja tratada a los tres ddi. Estas observaciones posiblemente se deban a un estrés ocasionado por las técnicas *per se*, lo cual no afectó el procedimiento de inoculación.

En la segunda evaluación (15 ddi), el 91,6% de las plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente mostraron síntomas de posible origen viral, mientras que, solo el 25% de las plantas de esta misma especie inoculadas por infiltración, mostraron igual sintomatología. En ambos casos, las plantas también mostraron síntomas en hojas nuevas como mosaicos cloróticos y encrespamiento, tal y como se observa en la figura 2A con los diferentes grados severidad.

A los 21 ddi, las plantas inoculadas presentaron síntomas evidentes de infección viral, manteniéndose estable el número de plantas enfermas respecto a la segunda observación. Los datos obtenidos muestran que la inoculación mecánica fue más eficiente con un 90% de plantas enfermas en comparación con la metodología de infiltración (21%) (figura 2B).

Figura 2. Sintomatología del CMV en hojas de *N. benthamiana* evaluadas a dos tiempos después de inoculación.



A. Hoja control inoculada con agua (Izquierda), hoja grado 2 con leve encrespamiento (centro) y hoja grado 3 con mosaico (derecha) a los 15 ddi. **B.** Hoja grado 3 con mancha clorótica (izquierda), hoja grado 5 con deformación (centro) y hoja grado 3 con deformación y mosaico fuerte (derecha) a los 21 ddi.

Respecto de las plantas de *N. tabacum* inoculadas con CMV mediante transmisión mecánica, solo el 33,3% presentaron sintomatología a los 15 ddi, en forma de manchas cloróticas y mosaicos leves (datos no mostrados); mientras que las plantas inoculadas por infiltración ninguna presentó sintomatología viral.

En este estudio, se identificaron factores que influyen en la transmisión efectiva del CMV, incluida la edad de las plantas al momento de la inoculación y la temperatura del entorno. La transmisión por inoculación mecánica favoreció la infectividad viral, lo cual se debe posiblemente a que la savia conserva una mayor concentración y estabilidad de las partículas virales [21].

El análisis visual realizado sobre las plantas inoculadas permitió la detección a los 15 ddi de síntomas característicos de infección por CMV (mosaico, enanismo encrespamiento y malformación de las hojas), lo que confirma inicialmente la presencia viral. Estos resultados concuerdan con los reportados por Troiano *et al.* [22], quienes observaron sintomatología viral 14 días después de la inoculación mecánica en plantas de *Nicotiana* spp. Del mismo modo, Jalender *et al.* [23] demostraron que al inocular mecánicamente plantas indicadoras con CMV, se obtienen síntomas evidentes a los 10-15 ddi, indicando que la concentración del virus aumenta a través del tiempo.

No obstante, Dheepa y Paranjothi [24] evaluando métodos de transmisión mecánica del CMV reportaron plantas de tabaco maduras que expresaban síntomas característicos de infección del virus, tres meses después de la inoculación. Estos resultados pueden atribuirse a variables ambientales, a condiciones de crecimiento, y a la edad de la planta al momento de la infección [25]. Este último factor juega un papel importante, ya que en plantas jóvenes el metabolismo es más activo, lo cual es aprovechado por los virus para su replicación y transcripción, lo que se traduce en una aparición más rápida de los síntomas [26].

Es importante destacar que en este estudio las plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* presentaron síntomas típicos causados por el CMV cuando la temperatura osciló entre 24 y 26°C en etapa temprana después de la inoculación. Igual resultado obtuvieron Zhao *et al.* [27], quienes reportaron síntomas severos en *N. tabacum* en etapa

temprana después de la inoculación del CMV a 28°C, asociado a un mayor nivel de replicación viral, indicando que la temperatura es un factor ambiental importante que controla el crecimiento y la respuesta inmune de la planta.

Detección viral mediante ImmunoStrip®

La prueba serológica para CMV realizada mediante el empleo de las tirillas de ImmunoStrip®, confirma la presencia del virus en las plantas de *N. benthamiana*, las cuales presentaron sintomatología, independiente del método de inoculación (figura 3A). Sin embargo, al evaluar las plantas de *N. tabacum* que presentaron sintomatología de posible presencia viral, el resultado de esta prueba fue no concluyente (figura 3B).

Figura 3. Test de ImmunoStrip® para la detección del CMV en plantas indicadoras. A. Test para CMV en *N. benthamiana* (P1). B. Test para CMV en *N. tabacum* (P2).



Un estudio realizado por Alhares y Al-Fadhel [28] en plantas indicadoras permitió identificar la presencia del CMV a través del empleo de ImmunoStrip®. Kwon *et al.* [29] también usaron esta técnica para comprobar que el CMV era el agente causal de manchas cloróticas y de malformación en plantas indicadoras. Del mismo modo, Chikh-Ali *et al.* [30] confirmaron mediante inmuno-tiras, la presencia de PVY, en la que el extracto de hojas de papa maceradas reaccionó con los anticuerpos específicos para este virus, mientras que en otras investigaciones se ha obtenido buena sensibilidad con el uso de inmuno-tiras [31, 32, 33].

Aunque las publicaciones mencionadas anteriormente reportan una buena sensibilidad para detectar la prevalencia viral, en este estudio, las muestras P2 y P3 no presentaron evidencia de infección tras realizar ensayos con ImmunoStrip®. Una posible explicación a este resultado (no concluyente), podría deberse a la baja concentración de partículas virales en las hojas analizadas [34], a una posible distribución desigual de las partículas del CMV en toda la planta, o a diversas tasas de translocación del virus en la planta [35].

Por lo anterior, los resultados obtenidos con las muestras P2 y P3 están acordes con los reportados por Liebenberg *et al.* [36], quienes evaluaron tirillas de ImmunoStrip® al compararlas con pruebas de DAS-ELISA y RT-PCR en 23 muestras de Vid para el Virus de la hoja en abanico de la vid (GFLV), encontrando que las tirillas no detectaron la presencia viral en el 17,4% del material evaluado. De forma similar, Simmons *et al.* [37] realizaron una verificación experimental de la transmisión del *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) usando pruebas de RT-PCR e ImmunoStrip®, mostrando que la prueba serológica no logra la identificación efectiva del virus.

Detección por RT-PCR

Se evaluó la eficiencia del protocolo de extracción de ARN teniendo en cuenta la calidad y la concentración final del ARN obtenido. La calidad, medida en función del ratio 260 nm/280 nm presentó valores entre 2,01 y 2,11, indicando una buena calidad del producto. En cuanto a la concentración se obtuvieron valores entre 328 y 734 ng.µL⁻¹. Así mismo, la calidad y cantidad del ARN extraído se evaluó por separación electroforética en geles de agarosa, observando bandas bien definidas de ARN ribosomal (datos no mostrados).

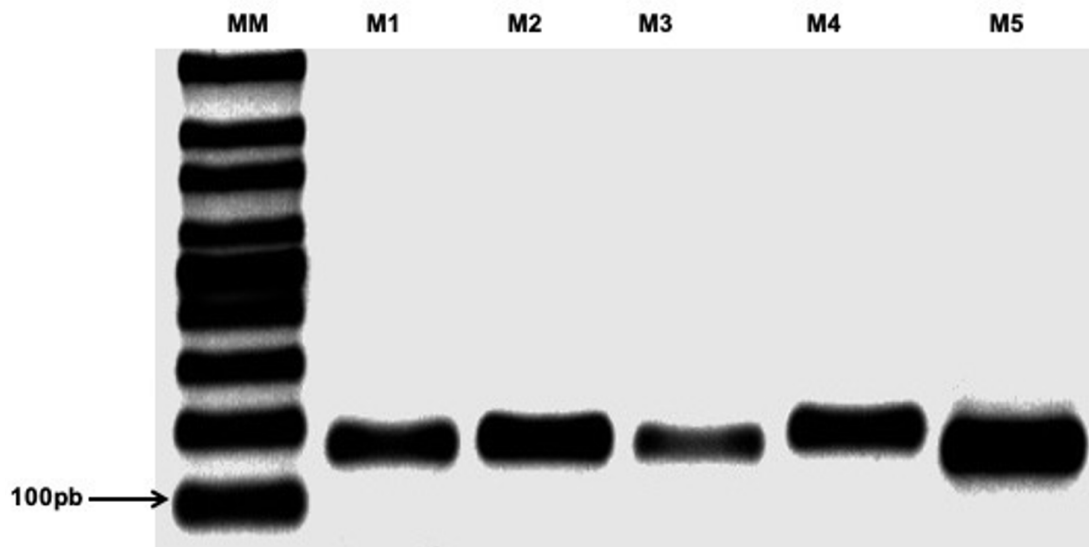
La detección de la presencia del CMV por PCR se realizó en tejidos de hojas sintomáticas a los 25 días después de efectuada la inoculación con el virus, utilizando para esto cebadores específicos (cuadro 1). La reacción de PCR con los ADNc de las muestras evaluadas permitió generar amplicones entre 165 y 190 pb, los cuales corresponden a los tamaños esperados (figura 4).

Los productos de PCR de las tres muestras enviadas a secuenciamiento confirmaron la presencia del CMV en las plantas inoculadas. Al comparar las secuencias consenso que codifican para la proteína de movimiento del CMV, con las publicadas en el banco de genes del NCBI, se observó 99% de identidad, resultado que confirma la presencia del CMV en las plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*.

La técnica de RT-PCR permitió la identificación efectiva del CMV en el material analizado, incluidas aquellas muestras en las cuales no se logró la detección mediante la técnica de ImmunoStrip®. Resultados similares se reportan en los estudios de Stammler *et al.* [38], quienes emplearon técnicas moleculares para la detección de patógenos, como una metodología alternativa para la validación de resultados de diagnóstico basados en pruebas serológicas. Así mismo, Iqbal *et al.* [39] demostraron la utilidad de los métodos moleculares para evaluar la incidencia del CMV en cultivos vegetales. Por su parte, Culal-Kilic *et al.* [40] reportan una mayor sensibilidad de la PCR en la detección de *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) con respecto a métodos serológicos.

Por otro lado, los altos niveles de identidad encontrados en este estudio por secuenciación (99%), coinciden con los reportados por Riascos *et al.* [41] y Mejía *et al.* [42], quienes identificaron virus vegetales usando RT-PCR y secuenciación de fragmentos de PCR, mostrando alta sensibilidad de detección viral entre las metodologías moleculares evaluadas. A pesar que los resultados de RT-PCR confirmaron la presencia viral en este estudio,

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de una muestra positiva para CMV, MM: marcador de peso molecular, M1 al M5; cebadores.



resulta importante incluir pruebas de detección que se apoyen en análisis de las secuencias de los productos de PCR generados, esto con el fin de evitar falsos positivos que podrían conducir a generar diagnósticos erróneos.

CONCLUSIONES

La transmisión mecánica del CMV fue más efectiva que la inoculación por infiltración, representando un método que facilita los estudios de diagnóstico y manejo de virus vegetales.

La RT-PCR fue más sensible y confiable que la prueba serológica (ImmunoStrip®) para la detección del virus en estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Minciencias y la Universidad de Caldas, por la financiación de esta investigación en el marco del Proyecto “Efectos de la aplicación de secuencias de ARN de cadena doble (ARNcd) en el silenciamiento del virus del mosaico del pepino (CMV)” códigos 0178917 y 1672118.

REFERENCIAS

- [1] ZHAO, LEI; FENG, CHAOHONG; WU, KUAN; CHEN, WENBAO; CHEN, YUJIA; HAO, XINGAN; WU, YUN-FENG. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: A review. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 135, 2017, p. 15-26.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.07.003>
- [2] GAUR, RAJARSHI-KUMAR; KHURANA, PAUL; DOROKHOV, YURI (Eds.). *Plant Viruses: Diversity, Interaction and Management*. Boca Raton-FL (USA): CRC Press, 2018, 387 p.
- [3] HAMMOND, ROSEMARIE. Economic significance of viroids in vegetable and field crops. En: *Viroids and satellites*. London (UK): Academic Press: 2017, p. 5-13.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00001-2>
- [4] SCHOLTHOF, KAREN-BETH; ADKINS, SCOTT; CZOSNEK, HENRYK; PALUKAITIS, PETER; JACQUOT, AMMANUEL; HOHN, THOMAS; HOHN, BARBARA; SAUNDERS, KEITH; CANDRESSE, THIERRY; AHLQUIST, PAUL; HEMENWAY, CYNTHIA; FOSTER, GARY. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v. 12, n. 9, 2011, p. 938-954.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- [5] VIVEROS-FOLLECO, YOHANA-MARITZA; GUZMÁN-PIEDRAHITA, ÓSCAR-ADRIÁN; VILLEGAS-ESTRADA, BERNARDO. Enfermedades en viveros comerciales de Musa AAB ‘Dominico hartón’ en el departamento de Caldas, Colombia. *Boletín científico centro de museos museo de Historia Natural*, v. 21, n. 2, 2017, p. 61-80.
<http://dx.doi.org/10.17151/bccm.2017.21.2.5>
- [6] RODRÍGUEZ, MARLON H.; NIÑO, NANCY E.; CUTLER, JOSEPH; LANGER, JULIANE; CASIERRA-POSADA, FÁNOR; MIRANDA, DIEGO; BANDTE, MARTINA; BÜTTNER, CARMEN. Certificación de material vegetal sano en Colombia: un análisis crítico de oportunidades y retos para controlar enfermedades ocasionadas por virus. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 10, n. 1, 2016, p. 164-175.
<http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i1.4921>
- [7] GALLO, YULIANA; TORO, LUISA-FERNANDA; JARAMILLO, HELENA; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS. Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 12, n. 2, 2018 p. 281-292.
<http://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7692>

- [8] PALUKAITIS, PETER; GARCIA-ARENAL, FERNANDO. Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, v. 62, 2003, p. 241-323.
[https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)62005-1](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)62005-1)
- [9] AEBIG, JOAN A.; KAMO, KATHRYN; HSU, HEI-TI. Biolistic inoculation of gladiolus with *Cucumber Mosaic Cucumovirus*. *Journal of virological methods*, v. 123, n. 1, 2005, p. 89-94.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.09.010>
- [10] RAJAMANICKAM, S.; KUMAR, RAJESH; KARTHIKEYAN, G. A potential tool for the detection of plant viruses through serological and molecular approaches. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 8, n. 3, 2019, p. 3046-3051.
- [11] HONG, JIN-SUNG; JU, HO-JONG. The plant cellular systems for plant virus movement. *The plant pathology journal*, v. 33, n. 3, 2017, p. 213-228. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.09.2016.0198>
- [12] MOCHIZUKI, TOMOFUMO; OHKI, SATOSHI. *Cucumber mosaic virus*: viral genes as virulence determinants. *Molecular plant pathology*, v. 13, n. 3, 2012, p. 217-225.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x>
- [13] NOURI, SHAHIDEH; ARÉVALO, RAFAEL; FALK, BRYCE; GROVES, RUSSELL. Genetic structure and molecular variability of *Cucumber Mosaic Virus* isolates in the United States. *PLoS One*, v. 9, n. 5, 2014, p. e96582. [10.1371/journal.pone.0096582](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096582)
- [14] QIU, Y.; WANG, C.; ZHU, S. A Review on the Pathogenicity of Cucumber Mosaic Virus. *Agricultural Biotechnology*, v. 7, n. 1, 2018, p. 87-91.
- [15] GONZÁLEZ-GARZA, RAMIRO. Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v. 35, n. 3, 2017, p. 591-610. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-1>
- [16] VARMA, ANUPAM; SINGH, MANOJ-KUMAR. En: *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies. Diagnosis of plant virus diseases*. Cambridge (USA): Academic Press, 2020, p. 79-92.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00006-2>
- [17] BALODI, REKHA; BISHT, SUNAINA; GHATAK, ABHIJEET. Plant disease diagnosis: Technological advancements and challenges. *Indian Phytopathology*, v. 70, n. 3, 2017, p. 275-281.
[10.24838/ip.2017.v70.i3.72487](https://doi.org/10.24838/ip.2017.v70.i3.72487)
- [18] KIRANKUMAR, K.C.; PRIYA, N.; JAYASUDHA, S.M.; BHAT, GOUREESH. En: *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies. Advances in protein-based diagnostic tools of plant viruses*. Cambridge (USA): Academic Press, 2020. p. 93-99.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00007-4>
- [19] BUITRÓN-BUSTAMANTE, JOHANNA-LIETH; MORILLO-VELASTEGUI, EDUARDO. Estandarización de un método de detección molecular del Cucumber mosaic virus (CMV) en banano ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, v. 18, n. 1, 2017, p. 113-124.
http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:562
- [20] HAJIA, MASOUD. Limitations of different PCR protocols used in diagnostic laboratories: a short review. *Modern Medical Laboratory Journal*, v. 1, n. 1, 2017, p. 1-6.
- [21] YADAV, KAVITA; YADAV, PRABHAT. The effect of different mechanism of transmission on transavability of *Tomato Mosaic Virus*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 6, n. 6 2017, p. 448-450.
- [22] TROIANO, ELISA; BELLARDI, MARIA-GRAZIA; PARRELLA, GIUSEPPE. *Syringa vulgaris* is a new host for *Cucumber Mosaic Virus*. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 58, n. 2, 2019, p. 385-389.
[10.14601/Phytopathol_](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_)
- [23] PORIKA, JALENDER; BHARATHI, BHAT. Studies on Transmission of *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) by Sap Inoculation in Tomato. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, v. 5, n. 4, 2017, p. 1908-1912.
<http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.5764>
- [24] DHEEPA, R.; PARANJOTHI, S. Transmission of *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) infecting banana by aphid and mechanical methods. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2010, p. 117-129.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.v22i2.4899>
- [25] PAUDEL, DINESH-BABU; SANFAÇON, HÉLÈNE. Exploring the diversity of mechanisms associated with plant tolerance to virus infection. *Frontiers in plant science*, v. 9, 2018, p. 1575.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01575>

- [26] LEVY, D.; LAPIDOT, M. Effect of plant age at inoculation on expression of genetic resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Archives of virology*, v. 153, n. 1, 2008, p. 171-179.
<https://doi.org/10.1007/s00705-007-1086-y>
- [27] ZHAO, FEIFEI; LI, YANAN; CHEN, LIJUAN; ZHU, LISHA; REN, HAN; LIN, HONGHUI; XI, DEHUI. Temperature dependent defence of *Nicotiana tabacum* against *Cucumber Mosaic Virus* and recovery occurs with the formation of dark green islands. *Journal of Plant Biology*, v. 59, n. 3, 2016, p. 293-301.
[10.1007/s12374-016-0035-2](https://doi.org/10.1007/s12374-016-0035-2)
- [28] ALFADHL, FADHL. Detection of cucumber mosaic virus on pepper by indicator plant immune strip and RT-polymerase chain reaction. *Kufa Journal for Agricultural Sciences*, v. 9, n. 4, 2017, p. 73-91.
- [29] KWON, SUN-JUNG; YOON, JU-YEON; CHOI, GUG-SEOUN; CHO, IN-SOOK. First Report of *Cucumber Mosaic Virus* in *Atractylodes macrocephala* in Korea. *Plant Disease*, v. 103, n. 2, 2019, p. 380-380.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1181-PDN>
- [30] CHIKH-ALI, MOHAMAD; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, MARÍANA; GREEN, KELSIE; KIM, DONG-JUN; CHUNG, SANG-MIN; KUHL, JOSEPH; KARASEV, ALEXANDER. Identification and molecular characterization of recombinant *Potato virus Y* (PVY) in potato from South Korea, PVY^{NTN} strain. *Plant disease*, v. 103, n. 1, 2019, p. 137-142.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0715-RE>
- [31] GREEN, KELSIE; CHIKH-ALI, MOHAMAD; HAMASAKI, RANDALL; MELZER, MICHAEL; KARASEV, ALEXANDER. *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Physalis peruviana* are unable to systemically infect potato or pepper and form a distinct new lineage within the PVY^C strain group. *Phytopathology*, v. 107, n. 11, 2017, p. 1433-1439.
<https://doi.org/10.1094/PDYTO-04-17-0147-R>
- [32] ALFADHL, FADHL; ZAGIER, S.S.S. Identification of *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) on eggplant by using some of indicator plants, ImmunoStrip assay and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Kufa Journal for Agricultural Science*, v. 9, n. 4, 2017, p. 92-107.
- [33] SIDOROVA, TATIANA; MIKHAILOV, ROMAN; PUSHIN, ALEXANDER; MIROSHNICHENKO; DOLGOV, SERGEY. Agrobacterium-mediated transformation of Russian commercial cv. 'Startovaya' (*Prunus domestica* L.) with virus-derived hairpin RNA construct confers durable resistance to PPV infection in mature plants. *Frontiers in plant science*, v. 10, n. 286, 2019, p. 286.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00286>
- [34] LIEBENBERG, ANNERIE; FREEBOROUGH, MICHAEL-JOHN; VISSER, CHRIS; BELLSTEDT, DIRK; BURGER, JOHAN. Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays". *Virus research*, v. 142, n. 1-2, 2009, p. 28-35.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.016>
- [35] DUPUIS, BRICE. The movement of *Potato virus Y* (PVY) in the vascular system of potato plants. *European Journal of Plant Pathology*, v. 147, n. 2, 2017, p. 365-373. [10.1007/s10658-016-1008-5](https://doi.org/10.1007/s10658-016-1008-5)
- [36] LIEBENBERG, ANNERIE; FREEBOROUGH, MICHAEL-JOHN; VISSER, CHRIS; BELLSTEDT, DIRK; BURGER, JOHAN. Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus research*, v. 142, n. 1-2, 2009, p. 28-35.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.016>
- [37] SIMMONS, H.E.; HOLMES, E.C.; GILDOW, F.E.; BOTHE-GORALCZYK; STEPHENSON, A.G. Experimental verification of seed transmission of Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Disease*, v. 95, n. 6, 2011, p. 751-754. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0843>
- [38] STAMMLER, JOHANNA; OBERNEDER, ANITA; KELLERMANN, ADOLF; HADERSDORFEER, JOHANNES. Detecting potato viruses using direct reverse transcription quantitative PCR (DiRT-qPCR) without RNA purification: an alternative to DAS-ELISA. *European Journal of Plant Pathology*, v. 152, n. 1, 2018, p. 237-248.
<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1468-x>

- [39] IQBAL, SHOMAILA; SHAH, HUSSAIN; ASHFAQ, MUHAMMAD; KHAN-KASSI, AJMAL. Standardization of PCR protocol to check diversity among Pakistani isolates of cucumber mosaic Cucumovirus (CMV) infecting chilli pepper. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 5, n. 3, 2017, p. 729-735.
- [40] CULAL-KILIC, HANDAN; YARDIMCI, NEJLA; BAL-ALÍ; GUNES-ALÍ, DENIZ-FATMA. Sensitive detection of tomato spotted wilt virus from pepper plants by DAS-ELISA, RT-PCR and IC-RT-PCR. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 22. n. 5, 2017, p. 12934-12939.
- [41] RIASCOS-CHICA, MELISSA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO ANDRÉS; MARIN-MONTOYA, MAURICIO-ALEJANDRO. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, v. 23. n. 1, 2018, p. 39-50.
<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n1.65683>
- [42] SIERRA-MEJÍA, ANDREA; GALLO-GARCÍA, YULIANA; ESTRADA-ARTEAGA, MEIKE; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Detección molecular de seis virus de ARN en brotes de tubérculos de papa criolla (*Solanum phureja*) en Antioquia Colombia. *Bioagro*, v. 32, n. 1, 2020, p. 3-14.

Efecto de *Bacillus subtilis* sobre metabolitos sanguíneos y parámetros productivos en pollo de engorde*

Effect of *Bacillus subtilis* on blood metabolites and productive parameters in broiler chickens

Efeito de *Bacillus subtilis* sobre metabólitos sanguíneos e parâmetros produtivos em frangos de corte

MAYA-ORTEGA, CARLOS-ABEL¹; MADRID-GARCÉS, TOMÁS-ANTONIO²;
PARRA-SUESCÚN, JAIME-EDUARDO³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 23 de Abril 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020.

* Título del proyecto de origen: "Evaluación de *Bacillus subtilis* sobre el desarrollo alométrico de órganos digestivos y variables productivas en pollo de engorde". Entidad financiadora: Universidad Nacional de Colombia, Convocatoria: registro único de proyectos, código HERMES 37384. Finalización: 5 de Diciembre de 2019.

- 1 Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Grupo de investigación BIOGEM. Zootecnista Msc. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5094-7716>
- 2 Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Grupo de investigación BIOGEM. Zootecnista MsC, Ph.D(c) Ciencias agrarias. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-4191-2343>
- 3 Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Grupo de investigación BIOGEM. Zootecnista MsC., Ph.D. Ciencias agrarias. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-4772-1326>

Correspondencia: camayao@unal.edu.co

RESUMEN

Los antibióticos han sido utilizados en la alimentación animal con el fin de garantizar una producción más eficiente; sin embargo, la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos ha causado preocupación tanto a consumidores como a científicos. El objetivo fue evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* sobre parámetros sanguíneos y productivos en pollos de engorde. 72 pollos de la línea Cobb 500, fueron aleatorizados a 3 dietas: dieta basal sin antibióticos (D1), y una dieta basal suplementada con 10 ppm de Avilamicina (D2), o 50 ppm de esporas de *B. subtilis* (D3) durante 42 días. Los días 21 y 42 se estimó la ganancia acumulada de peso (GAP), la conversión alimenticia (CA) y se evaluaron las concentraciones sanguíneas de alanina aminotransferasa (ALT), creatinina, triglicéridos, colesterol, glucosa, calcio y fósforo. El uso *B. subtilis* en la dieta mejoró el rendimiento productivo de las aves, disminuyó las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol y ALT, e incrementó las concentraciones de calcio, fósforo y glucosa. La inclusión de *B. subtilis* en la dieta de pollos de engorde es una alternativa al uso de antibióticos, ya que tiene efectos favorables sobre la bioquímica sanguínea y el rendimiento productivo de las aves.

ABSTRACT

Antibiotics have been used in animal feed in order to ensure more efficient production, however, the appearance of antibiotic resistant bacteria has caused concern in both consumers and scientific. The aim was to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* on blood parameters and performance in broilers. 72 Cobb 500 broiler chicks, were randomized to 3 diets. A basal diet without antibiotics (D1), or a basal diet supplemented with either 10 ppm of avilamicyn (D2) or 50 ppm of spores of *B. subtilis* (D3) during 42 days. On days 21 and 42 cumulative weight gain (BW), feed conversion (FCR) was estimated and blood concentrations of alanine aminotransferase (ALT), creatinine, triglycerides, cholesterol, glucose, calcium and phosphorus were evaluated. The use of *B. subtilis* in the diet improves the performance of broilers, lowers the blood levels of triglycerides, cholesterol and ALT blood concentrations, and increase the blood levels of calcium, phosphorus and glucose. The inclusion of *B. subtilis* in the diet of broilers is an alternative to the use of antibiotics, as it has positive effects on the blood biochemistry and the performance.

RESUMO

Antibióticos têm sido utilizados na alimentação animal, a fim de garantir uma produção mais eficiente; no entanto, o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos causou preocupação a consumidores e cientistas. O objetivo foi

PALABRAS CLAVE:

Antibiótico; Avicultura; Bioquímica Sanguínea; Probiótico; Rendimiento Productivo.

KEYWORDS:

Antibiotic; Poultry; Blood biochemistry; Probiotic; Performance.

PALAVRAS-CHAVE:

Antibiótico; Avicultura; Bioquímica do sangue; Probiótico; Rendimento produtivo.

Cómo citar este artículo: MAYA-ORTEGA, CARLOS-ABEL; MADRID-GARCÉS, TOMÁS-ANTONIO; PARRA-SUESCÚN, JAIME-EDUARDO. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre metabolitos sanguíneos y parámetros productivos en pollo de engorde. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 105-116. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)105-116](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)105-116)

avaliar o efeito de *Bacillus subtilis* no sangue e parâmetros produtivos em frangos de corte. 72 galinhas da linha Cobb 500 foram randomizadas para 3 dietas. Uma dieta basal sem antibióticos (D1) ou uma dieta basal suplementada com 10 ppm de Avilamicina (D2) ou 50 ppm de esporos de *B. subtilis* (D3) por 42 dias. Nos dias 21 e 42, foi estimado o ganho de peso acumulado (GAP), a conversão alimentar (CA) e os níveis sanguíneos de alanina aminotransferase (ALT), creatinina, triglicéridos, colesterol, glicose, cálcio e fósforo. O uso de *B. subtilis* na dieta melhorou o desempenho produtivo das aves, diminuiu as concentrações séricas de triglicéridos, colesterol e ALT e aumentou as concentrações de cálcio, fósforo e glicose. A inclusão de *B. subtilis* na dieta de frangos de corte é uma alternativa ao uso de antibióticos, pois possui efeitos favoráveis na bioquímica sanguínea e no desempenho produtivo de aves.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de alimentos como consecuencia del crecimiento acelerado de la población mundial, ha llevado a los sistemas pecuarios a ser cada vez más eficientes, con el fin de producir alimentos en grandes volúmenes que cumplan con los estándares sanitarios y las exigencias del consumidor [1].

Con el fin de satisfacer las demandas de proteína de origen animal, la industria avícola evolucionó a producciones cada vez más intensivas. Según reportes de la FAO, se tiene proyectado que, en el año 2020, la carne de pollo será la más consumida a nivel mundial [2]. Actualmente, se cuenta con aves genéticamente más productivas y eficientes, pero menos adaptadas a condiciones de estrés y más susceptibles a problemas de salud y desequilibrios en la microbiota normal del intestino [2,3].

Durante los últimos años, los antibióticos han sido utilizados en la alimentación avícola como una medida para garantizar altos niveles de producción, eficiencia y rentabilidad de las granjas, además de brindar mejor salud y bienestar a las aves [4,5]. Sin embargo, la exposición de los animales a dosis subterapéuticas diarias de antibióticos como una medida profiláctica independiente de su estado de salud, ha conllevado a la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, a la acumulación de estos residuos en el producto final, y a la presentación de desbalances en la microbiota normal del intestino [5]. Debido a lo anterior, y a la creciente preocupación de la comunidad científica, la unión europea prohibió el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (APC) en la producción animal desde enero de 2006 [3,6].

Dado que la prohibición de los APC provoca un impacto desfavorable sobre la producción, los investigadores se han dado a la tarea de buscar alternativas biológicamente seguras para el consumidor final, entre las que se ha estudiado el uso de probióticos [7,8,9]. Los probióticos son definidos como microorganismos vivos no patógenos, que cuando son administrados en cantidades adecuadas ejercen efectos benéficos sobre la salud del hospedador [7,10]. Entre la innumerable cantidad de probióticos que se han estudiado, *Bacillus subtilis* ha presentado atributos que permiten su utilización en la alimentación animal, tales como la capacidad de generar esporas bajo situaciones de estrés, lo que le permite tolerar altas temperaturas durante la elaboración del alimento balanceado, y resistir el pH ácido del estómago; además, *Bacillus subtilis* ejerce efectos benéficos a nivel intestinal como la estimulación del sistema inmune, el desarrollo del tracto gastrointestinal y la modulación/cambio de la microbiota intestinal [7,11,12].

Los cambios en la composición microbiana, debido a bacterias indeseadas (patógenas) en intestino, puede ser causada por diferentes factores, principalmente alimenticios; estos desbalances microbianos pueden afectar notablemente el metabolismo y verse reflejado a nivel sanguíneo por diferentes compuestos e intermediarios del metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos [13]. El estudio y análisis de algunos parámetros bioquímicos sanguíneos permiten hacer un monitoreo de la integridad del tracto gastrointestinal, funcionalidad de órganos indispensables en los procesos digestivos como el hígado y el páncreas, identificar enfermedades metabólicas y deficiencias nutricionales sin afectar el bienestar y comportamiento productivo del animal, por se evaluó el efecto de *Bacillus subtilis* como alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento sobre parámetros sanguíneos como alanina aminotransferasa, creatinina, fósforo, calcio, glucosa, triglicéridos y colesterol y su relación con parámetros productivos en pollos de engorde.

MÉTODO

Consideraciones éticas

Los procedimientos experimentales llevados a cabo dentro del estudio siguieron los lineamientos estipulados en las guías “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (2012). Esta investigación fue avalada por El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales-CICUA de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED-013. Mayo 04 de 2018).

Localización

El trabajo de campo se realizó en las instalaciones de la Estación Agraria San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín), ubicada en el municipio de Rionegro (oriente de Antioquia), vereda El Tablazo, a una altitud promedio de 2.100 msnm, con una temperatura entre 12 y 18°C y humedad relativa del 75%, en una zona de vida bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB).

Animales

Para la realización del estudio se utilizaron 72 animales de la línea genética ROSS308, de un día de nacidos, suministrados por una casa genética comercial. Los animales se alojaron en corrales de piso de 0,25 m² para recrear las condiciones de densidad de una producción comercial y las prácticas de manejo, plan vacunal (día 8 y 20 de vida se aplicó Gumboro y Newcastle vía ocular) y equipos empleados fueron similares a los implementados en una granja comercial. El periodo experimental tuvo una duración de 42 días.

Manejo sanitario

El galpón donde se recibieron las aves se preparó previamente teniendo en cuenta todos los protocolos de bioseguridad: lavado, limpieza y desinfección de las instalaciones, cortinas, criadoras, comederos y bebederos. Adicionalmente, se realizó un estricto control de roedores e insectos. Cinco horas antes de la llegada de los pollitos, las criadoras fueron encendidas, con la finalidad de precalentar el galpón y alcanzar una temperatura promedio de 32°C al momento de la recepción de los mismos [14].

Dietas

Las aves fueron alimentadas con una dieta basal (cuadro 1) que consistió en una dieta comercial sin la adición de antibiótico o probiótico (*Bacillus subtilis*), conformando cada una de las dietas así: dieta basal (D1): sin la adición de antibiótico y probiótico (*Bacillus subtilis*), dieta 2 (D2): dieta basal más la adición de antibiótico promotor de crecimiento (APC-avilamicina) y dieta 3 (D3): dieta basal más la adición de probiótico (*Bacillus subtilis*).

El plan de alimentación fue dividido en dos etapas, para lo cual se realizó una dieta de iniciación (1-21 días) y finalización (22-42 días), cumpliendo los requerimientos nutricionales establecidos por la distribuidora comercial. La adición del antibiótico (avilamicina) en el alimento (D2), se realizó según las indicaciones de la casa productora, a razón de 10 ppm. La cantidad de *Bacillus subtilis* incorporada en D3, se llevó a cabo atendiendo la recomendación del fabricante, esto es 50 ppm para garantizar una dosis de 10⁸ UFC.

Cuantificación de metabolitos sanguíneos

Para este análisis se tomaron 5 mL de sangre por ave los días 1, 21 y 42. Haciendo uso de una aguja de 25 mm se realizó punción cardíaca, específicamente en el ventrículo izquierdo, para la extracción de sangre en un tubo de ensayo con anticoagulante. Cada una de las muestras se conservó en frío a 4°C para su transporte al laboratorio, donde fueron centrifugadas a 1600 rpm durante 10 minutos para separar el plasma en alícuotas

y posteriormente ser analizadas [13]. Se realizaron mediciones de los siguientes metabolitos: Alanina amino-transferasa-ALT (U/L), creatinina (mg/dL), fósforo (mg/dL), calcio (mg/dL), glucosa (mg/dL), triglicéridos (mg/dL) y colesterol (mg/dL). La cuantificación en suero se realizó mediante un estuche comercial (DIA.PRO Diagnostic Bioprobes), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de parámetros productivos

Los días 21 y 42 del experimento, se evaluaron los siguientes parámetros productivos (Ecuaciones 1 y 2) [15,16]:

Conversión alimenticia acumulada (CA)

$$CA = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Peso ganado}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Ganancia de peso acumulada (GAP):

$$GAP = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Edad (días)}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Cuadro 1. Aporte nutricional de la dieta basal (D1) diseñada en dos etapas (iniciación y finalización).

Aporte nutricional por etapa		Iniciación	Finalización
Nutrientes	Unidad	Valor	Valor
Humedad	%	10,926	10,845
E.m. aves	KCAL/kg	3152	3299
Proteína bruta	%	21,474	19,976
Grasa	%	8,301	10,213
Extracto Libre de N (ELN)	%	49,673	50,195
Fibra bruta	%	2,927	2,801
Cenizas	%	6,108	5,379
Calcio	%	0,997	0,832
Fósforo disp.	%	0,418	0,360
Fósforo total	%	0,648	0,580
B. Electrolítico	mEq/kg	216,164	191,553
Lisina	%	1,363	1270
Metionina	%	0,650	0,602
Met + cist	%	0,993	0,924
Treonina	%	0,901	0,825
Triptófano	%	0,242	0,222
Arginina	%	1,336	1,228
Isoleucina	%	0,881	0,815
Leucina	%	1,902	1,802
Valina	%	1,042	0,915
Histidina	%	0,547	0,509
Fenilalanina	%	1,061	0,989
Fenil & tiro	%	1,953	1,828
Glicina	%	0,875	0,808
Alanina	%	1,158	1.103

Diseño estadístico

Se realizó un modelo de parcelas divididas bajo un esquema de aleatorización completamente al azar con 6 tratamientos (dieta*edad) y 3 repeticiones (corral) por tratamiento (4 pollos por repetición). Las parcelas grandes estuvieron constituidas por las dietas y las subparcelas por los diferentes días de muestreo. Cada animal fue asignado aleatoriamente a cada uno de los tratamientos (dieta*edad). El análisis estadístico fue realizado haciendo uso del procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales) PROC MIXED del SAS® software, versión 9.4 [17]. Se realizó una prueba de comparaciones múltiples de medias mediante el método de diferencia significativa honesta (DSH) de tuckey haciendo uso de la función MEANS TRAT del SAS® software, versión 9.4 con el fin de determinar diferencias significativas.

RESULTADOS

En general, las aves presentaron un buen estado de salud, sin la presencia de signos adversos de enfermedad que causara su retiro y/o sacrificio antes de terminar el periodo experimental. Adicionalmente, las aves consumieron la ración diaria de alimento ajustada a la guía de manejo de la línea genética. En el análisis estadístico de los resultados no se encontró interacción estadística entre la dieta y la edad de muestreo para ninguna de las variables en estudio, por ello no se hizo necesario analizar cada uno de los factores de forma independiente.

En el cuadro 2 se presentan las concentraciones sanguíneas de alanina aminotransferasa y creatinina. La evaluación de alanina aminotransferasa (ALT) presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las dietas evaluadas al día 21 de edad, siendo el valor más bajo el de aquellas aves alimentadas con D3 (*B. subtilis*). En el día 42 de vida se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre D1 y D3, donde D3 presentó los valores más bajos. De igual manera, los niveles de Creatinina presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las dietas evaluadas, donde D1 presentó los valores más altos, mientras que D2 y D3 no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los periodos evaluados.

Los niveles de glucosa (cuadro 3) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las distintas dietas para los periodos evaluados, donde el uso de *Bacillus subtilis* en la dieta aumentó los niveles de glucosa a los 21 y 42 días con respecto a los demás tratamientos, mientras que D1 presentó los valores más bajos de glucosa.

Cuadro 2. Efecto de la dieta sobre las concentraciones sanguíneas de Alanina aminotransferasa y Creatinina analizadas a los 1, 21 y 42 días de edad.

Parámetros	Edad			
	1	21	42	EEM
Alanina aminotransferasa (UI/L)				
D1	3,11 ^A	3,82 ^A	8,50 ^A	0,60
D2	3,11 ^A	2,56 ^B	6,70 ^{AB}	
D3	3,11 ^A	1,76 ^C	5,65 ^B	
Creatinina (mg/dL)				
D1	0,235 ^A	0,373 ^A	0,274 ^A	0,02
D2	0,235 ^A	0,325 ^B	0,255 ^B	
D3	0,235 ^A	0,325 ^B	0,250 ^B	
A, B, C Comparaciones dentro de una misma columna, medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0,05). EEM: Error estándar de la media. D1: Dieta control sin antibiótico ni probiótico. D2: Alimento comercial con antibiótico. D3: Alimento comercial con Bacillus subtilis.				

En el cuadro 3 se presentan las concentraciones sanguíneas de colesterol y triglicéridos. En cuanto a los niveles sanguíneos de colesterol, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al día 21 entre las tres dietas estudiadas, mientras que al día 42, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre D2 y D3. Por su parte, los niveles de triglicéridos mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las distintas dietas evaluadas. Los niveles más bajos de triglicéridos para los días 21 y 42 de vida fueron encontrados en aquellas aves que recibieron *Bacillus subtilis* en la dieta.

Cuadro 3. Efecto de la dieta sobre las concentraciones sanguíneas de glucosa, triglicéridos y colesterol analizados a los 1, 21 y 42 días de edad.

Parámetro	Edad			
	1	21	42	EEM
Triglicéridos (mg/dL)				
D1	128,1 ^A	199,3 ^A	141,5 ^A	0,5
D2	128,1 ^A	194,1 ^B	134,0 ^B	
D3	128,1 ^A	191,0 ^C	127,0 ^C	
Colesterol (mg/dL)				
D1	131,7 ^A	186,0 ^A	144,5 ^A	0,4
D2	131,7 ^A	182,5 ^B	136,5 ^B	
D3	131,8 ^A	163,0 ^C	134,0 ^B	
Glucosa (mg/dL)				
D1	267,3 ^A	287,3 ^A	321,5 ^A	0,5
D2	267,3 ^A	292,8 ^B	337,5 ^B	
D3	267,3 ^A	300,0 ^C	351,0 ^C	

^{A, B, C} Comparaciones dentro de una misma columna, medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0,05). EEM: Error estándar de la media. D1: Dieta control sin antibiótico ni probiótico. D2: Alimento comercial con antibiótico. D3: Alimento comercial con *Bacillus subtilis*.

Finalmente, los valores de calcio y fósforo (cuadro 4) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes dietas, donde el uso de *Bacillus subtilis* en la dieta incrementó de manera significativa la concentración sanguínea de ambos nutrientes en sangre.

Cuadro 4. Efecto de la dieta sobre las concentraciones sanguíneas de calcio y fósforo analizados a los 1, 21 y 42 días de edad.

Parámetros	Edad			
	1	21	42	EEM
Calcio (mg/dL)				
D1	8,890 ^A	10,52 ^A	11,51 ^A	0,02
D2	8,890 ^A	10,74 ^B	11,74 ^B	
D3	8,890 ^A	11,53 ^C	13,09 ^C	
Fósforo (mg/dL)				
D1	7,100 ^A	8,160 ^A	8,945 ^A	0,03
D2	7,100 ^A	8,850 ^B	9,631 ^B	
D3	7,100 ^A	9,155 ^C	10,35 ^C	

^{A,B,C} Comparaciones dentro de una misma columna, medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0;05). EEM: Error estándar de la media. D1: Dieta control sin antibiótico ni probiótico. D2: Alimento comercial con antibiótico. D3: Alimento comercial con *Bacillus subtilis*.

En el cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos para las variables productivas evaluadas. En cuanto a la tasa de conversión alimenticia no se presentó diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$) entre las diferentes dietas al día 21; no obstante, dicho parámetro presentó diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre dietas el día 42, donde la adición de *Bacillus subtilis* evidencia un efecto similar al uso de avilamicina como APC. Por su parte, la ganancia acumulada de peso fue significativamente más alta en las aves que recibieron el probiótico en comparación con las demás dietas.

Estudios previos han demostrado una disminución de los niveles sanguíneos de ALT en aves que fueron alimentados con dietas que contenían *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* y *Saccharomyces boulardii* [18,19,20]. Abramowicz *et al.*, 2019, encontraron que el uso de cultivos vivos de *B. subtilis* en la dieta reduce de manera significativa la actividad de la alanina transferasa.

Niveles bajos de ALT están asociados a una buena salud y funcionalidad del hígado, y a la ausencia de agentes patógenos, como *E. coli*, en el organismo [7,20,21,22].

Bioensayos llevados a cabo por Sharma *et al.*, (2015) en pollos que recibieron una mezcla de probióticos del género *Bacillus*, presentaron concentraciones bajas de creatinina en sangre, en comparación con aquellas aves que fueron adicionadas con Bacitracina de zinc en el alimento [22]. De manera similar, en el presente estudio las aves que recibieron *Bacillus subtilis* en la dieta presentaron valores más bajos de creatinina en sangre. Estudios en los cuales se han evaluado los niveles sanguíneos de creatinina, han correlacionado niveles altos de creatinina en pollos infectados con el virus de Newcastle [23].

Se ha reportado que algunos microorganismos probióticos tienen la habilidad de modificar las concentraciones de colesterol en sangre, a través de la disgregación de sales biliares en compuestos biliares libres o ligando directamente el colesterol proveniente de la dieta durante el proceso de digestión de las grasas, disminuyendo así la absorción de colesterol en el tracto gastrointestinal de las aves [24,25]. Al analizar los resultados obtenidos en el presente estudio, los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, fueron menores en aquellas aves que recibieron *Bacillus subtilis* en la dieta; estudios previos en los cuales se ha utilizado *Bacillus subtilis* como probiótico han mostrado resultados similares a los de este estudio [18,20,25,26,27].

Cuadro 5. Parámetros productivos evaluados los días 21 y 42 en pollos alimentados con una dieta basal o dieta basal suplementada con antibiótico (avilamicina) o probiótico (*Bacillus subtilis*).

Parámetros	Edad		
	21	42	EEM
C.A			
D1	1,68 ^A	1,56 ^A	0,02
D2	1,67 ^A	1,46 ^{AB}	
D3	1,57 ^A	1,41 ^B	
G.A.P			
D1	595,5 ^A	2808,5 ^A	2,31
D2	598 ^A	2887,5 ^B	
D3	628,6 ^B	2950,5 ^C	

^{A, B, C} Comparaciones dentro de una misma columna, medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0,05). EEM: Error estándar de la media. D1: Dieta control sin antibiótico ni probiótico. D2: Alimento comercial con antibiótico. D3: Alimento comercial con *Bacillus subtilis*. C.A (conversión alimenticia), G.A.P (ganancia acumulada de peso).

Es importante resaltar que la glucosa es la principal fuente para la obtención de energía necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos del organismo implicados en el anabolismo, por lo cual sus concentraciones en sangre son un factor importante para el buen funcionamiento de las vías metabólicas implicadas en la acreción proteica del músculo [28]. En el presente estudio, el uso de *Bacillus subtilis* incrementó las concentraciones de glucosa en sangre de manera significativa con respecto a los demás tratamientos, lo cual concuerda con los resultados encontrados en algunos estudios, en donde las aves alimentadas con una mezcla comercial de probióticos presentaron niveles mayores de glucosa en comparación con aquellas aves que no recibieron probióticos [28,29]. Sin embargo, algunos estudios realizados en pollos de engorde han mostrado que el uso de *Bacillus subtilis* en el alimento disminuye de manera significativa los niveles de glucosa en comparación con aquellas aves que recibieron una dieta sin adición de ningún agente antimicrobiano en el alimento [26,27].

Se ha encontrado que el uso de probióticos en la dieta favorece el desarrollo morfométrico del intestino, incrementando la altura y ancho de las vellosidades, lo cual se ve reflejado en una mayor área de contacto con el contenido intestinal, haciendo más eficiente los procesos de absorción de algunos nutrientes, principalmente calcio y fósforo, lo cual puede ser corroborado en los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual las aves que recibieron *Bacillus subtilis* en la dieta, presentaron concentraciones más altas de calcio y fósforo en sangre en comparación con los otros tratamientos [30,31,32]. Sin embargo, un estudio realizado por Saksrithai, Willits, & King, 2019, en gallinas ponedoras, a las cuales se les suministró una mezcla de probióticos en el agua de bebida, encontraron que el uso de probióticos no tuvo un efecto significativo en la concentración de calcio y fósforo en sangre con respecto a aquellas aves que recibieron un APC en la dieta [33].

Se ha evidenciado que los probióticos actúan bajo diferentes modos de acción, mejorando el rendimiento productivo y la salud intestinal de las aves. Los probióticos pueden mejorar el rendimiento productivo de las aves manteniendo un balance saludable de bacterias en el intestino por exclusión competitiva contra las bacterias patógenas o inhibiendo su crecimiento por la producción de ácidos orgánicos, lo cual mejora el ambiente intestinal y favorece la absorción de nutrientes [7,10]. Algunos estudios realizados en aves han mostrado que el uso de *Bacillus subtilis* tienen efectos positivos sobre los parámetros productivos, incrementando las ganancias de peso y mejorando la tasa de conversión alimenticia [34,35,36]. Los incrementos en el rendimiento productivo son el resultado de una mayor eficiencia en los procesos de digestión y absorción de los nutrientes. Un trabajo de campo realizado por Jayaraman *et al.*, (2017) reportaron que la inclusión de *Bacillus subtilis* mejora la histomorfología del intestino, principalmente incrementando la altura y ancho de las vellosidades a nivel de duodeno y yeyuno, segmentos donde se dan los mayores procesos de digestión y absorción de los nutrientes a nivel intestinal [37], mejorando así la digestibilidad de los nutrientes.

Borojeni *et al.*, (2018), reportaron que la suplementación de *B. subtilis* mejora la digestibilidad aparente, haciendo más eficiente el uso de los nutrientes presentes en la dieta, lo cual se ve reflejado en mayores ganancias diarias de peso y una menor tasa de conversión alimenticia [38].

CONCLUSIONES

La inclusión de *Bacillus subtilis* en la dieta de pollos de engorde constituye una alternativa para la sustitución parcial de antibióticos como promotores de crecimiento, ya que supone un incremento en metabolitos sanguíneos como glucosa, calcio y fósforo, y una disminución en el perfil lipídico, ALT y creatinina; además de mejorar el rendimiento productivo de las aves, indicando una mayor eficiencia en los procesos de absorción y aprovechamiento de los nutrientes suministrados en la dieta.

REFERENCIAS

- [1] GUZMAN, Y.E.; NAVARRO C.A.; ROA, M.L. Efecto del uso de probióticos en la morfometría intestinal de pollos de engorde. *Archivos De Zootecnia*, v. 67, n. 257, 2018, p. 93–98.
<https://doi.org/10.21071/az.v0i0.3878>
- [2] FENELON, MARK; HAYES, MARIA; HENCHION, MAEVE; MULLEN, ANNE-MARIA; TIWARI, BRIJESH. Future protein supply and demand: strategies and factors Influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, v. 6, n. 7, 2017, p. 1-21.
10.3390/foods6070053
- [3] SOKALE, A.O.; MENCONI, A.; MATHIS, G.F.; LUMPKINS, B.; SIMS, M.D.; WHELAN, R.A.; DORANALLI, K. Effect of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the intestinal structural integrity and growth performance of broiler chickens under necrotic enteritis challenge. *Poultry Science*, v. 98, n. 11, 2019, p. 5392–5400.
<https://doi.org/10.3382/ps/pez368>
- [4] KROCKO, MIROSLAV; CANIGOVÁ, MARGITA; BEZEKOVA, JANA; LAVOVÁ, MONIKA; HASCÍK, PETER; DUCKOVÁ, VIERA. Effect of nutrition with propolis and bee pollen supplements on bacteria colonization pattern in gastrointestinal tract of broiler chickens. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, v. 45, n. 1, 2012, p. 63–67.
- [5] KIM, IN-HO; MOHAMMADIGHEISAR, MOHSEN. Phytobiotics in poultry and swine nutrition - a review. *Italian Journal Of Animal Science*, v. 17, n. 1, 2018, p. 92-99.
10.1080/1828051X.2017.1350120
- [6] REIS, M.P.; FASSANI, E.J.; GARCIA-JÚNIOR, A.A.P.; RODRIGUES, P.B.; BERTECHINI, A.G.; BARRET, N.; PERSIA, M.E.; SCHMIDT, C.J. Effect of *Bacillus subtilis* (DSM 17299) on performance, digestibility, intestine morphology, and pH in broiler chickens. *Journal Of Applied Poultry Research*, v. 26, n. 4, 2017, p. 573–583.
<https://doi.org/10.3382/japr/pfx032>
- [7] SUGIHARTO, SUGIHARTO. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal Of The Saudi Society Of Agricultural Sciences*, v. 15, n. 2, 2016, p. 99–111.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>
- [8] MEHDI, YUCEF; LÉTOURNEAU-MONTMINT, MARIE-PIERRE; GAUCHER, MARIE-LOU; CHORFI, YOUNES; SURESH, GAYATRI; ROUISSI, TAREK; KAUR-BRAR, SATINDER; COTÉ, CAROLINE; AVALOS-RAMIREZ, ANTONIO; GODBOUT, STÉPHANE. Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, v. 4, n. 2, 2018, p. 170–178.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
- [9] SALIM, HOSSAN M.D.; SHAHIDUL-HUQUE, KHAN; KAMARUDDIN, KAZI M.; HAQUE-BEG, ANWARUL. Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. *Science Progress*, v. 101, n. 1, 2018, p. 52–75.
10.3184/003685018X15173975498947
- [10] NAGAE-KURITZA, LEANDRO; WESTPHAL, PATRICK; SANTIN, ELIZABETH. Probióticos na avicultura. *Ciência Rural*, v. 44, n. 8, 2014, p. 1457–1465.
10.1590/0103-8478cr20120220
- [11] BROWN, KIRSTY; UWIERA, RICAR, R.E.; KALMOKOFF, MARTIN L.; BROOKS, STEVE P.J.; INGLIS, DOUGLAS. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, v. 49, n. 1, 2017, p. 12–24.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>
- [12] QIN, CHUBIN; GONG, LI; ZHANG, XIAOPING; WANG, YUANYUAN; WANG, YIBIN; WANG, BAIKUI; LI, YALI; LI, WEIFEN. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. *Animal Nutrition*, v. 55, n. 3, 2018, p. 63-67.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.004>
- [13] LONDOÑO-PÉREZ, SANTIAGO; PARRA-SUESCÚN, JAIME. Efecto de la adición de cepas probióticas sobre metabolitos sanguíneos en cerdos en crecimiento. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 13, n. 2, 2015, p. 45-56.
10.18684/BSAA(13)49-56

- [14] AVIAGEN. Ross 308 AP. *Objetivo de rendimiento*. 2017. Disponible: http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross308AP-Broiler-PO-2017-ES.pdf [citado 22 de Julio de 2020].
- [15] LÓPEZ-HERRERA, A.; MADRID-GARCÉS, T.A.; PARRA-SUESCÚN, J.E. La ingesta de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) mejora la morfología intestinal en Broilers. *Archivos De Zootecnia*, v. 66, n. 254, 2017, p. 287–299.
<https://doi.org/10.21071/az.v0i0.3876>
- [16] CHÁVEZ, L.A.; LÓPEZ, A.; PARRA, J.E. Crecimiento y desarrollo intestinal de aves de engorde alimentadas con cepas probióticas. *Archivos De Zootecnia*, v. 65, n. 249, 2016, p. 51–58.
<https://doi.org/10.21071/az.v65i249.441>
- [17] SAS/STAT®. Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute. *User's Guide, Version 9.4th Ed.* Cary, NC: SAS Institute Inc. 2017. Disponible: https://www.sas.com/content/dam/SAS/en_us/doc/factsheet/stat-101372.pdf [citado 22 de Julio de 2020].
- [18] AHMAD, NAZIM; HAQUE, IQRAMUL; ALAM-MIAH, MOHAMMAD. Comparative analysis of body weight and serum biochemistry in broilers supplemented with some selected probiotics and antibiotic growth promoters. *Journal Of Advanced Veterinary And Animal Research*, v. 4, n. 3, 2017, p. 288–294.
<http://doi.org/10.5455/javar.2017.d226>
- [19] ABRAMOWICZ, KATARZYNA; KRAUZE, MAGDALENA; OGNIK, KATARZYNA. The effect of a probiotic preparation containing *Bacillus subtilis* PB6 in the diet of chickens on redox and biochemical parameters in their blood. *Annals Of Animal Science*, 2019, p. 1–33.
10.2478/aoas-2018-0059
- [20] HEDAYATI, M.; KHALAJI, S.; MANAFI, M.; PIRANY, N. Efficacy of *Bacillus subtilis* and bacitracin methylene disalicylate on growth performance, digestibility, blood metabolites, immunity, and intestinal microbiota after intramuscular inoculation with *Escherichia coli* in broilers. *Poultry Science*, v. 95, n. 5, 2017, p. 1174–1183.
<https://doi.org/10.3382/ps/pew347>
- [21] CALVO, E.; CELI, PIETRO; KLUENTER, A.M.; PÉREZ- SCHMEISSER, J.; VERLHAC, VIVIANE. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science And Technology*, v. 250, n. 1, 2019, p. 9–31.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.012>
- [22] JAKHAR, K.K.; KUMAR, SARVAN; NEHRA, VIKAS; SHARMA, VIKASH. Biochemical studies in experimentally *Escherichia coli* infected broiler chicken supplemented with neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Veterinary World*, v. 8, n. 11, 2015, p. 1340–1345.
10.14202/vetworld.2015.1340-1345
- [23] ISMAIL, HAGER-TAREK. Biochemical and hematological studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaves aqueous extract on Newcastle disease vaccine and infection in broiler chickens. *International Journal Of Recent Scientific Research*, v. 8, n. 3, 2017, p. 15876–15884.
<http://dx.doi.org/10.24327/ijrsr.2017.0803.0002>
- [24] HUSSEIN, E.; SELIM, S. Efficacy of yeast and multi-strain probiotic alone or in combination on growth performance, carcass traits, blood biochemical constituents, and meat quality of broiler chickens. *Livestock Science*, v. 216, n. 1, 2018, p. 153–159.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.08.008>
- [25] FOO, H.L.; HASHEMI, S.M.; LOH, T.C. Liquid metabolite of *Lactobacillus plantarum* and putrescine effects on growth, tissue polyamine, blood lipids and intestine morphology of broiler chickens. *Iranian Journal Of Applied Animal Science*, v. 8, n. 2, 2018, p. 333–342.
- [26] GONG, LI; WANG, BAIKUI; MEI, XIAOQIANG; XU, HAN; QIN, YAN; LI, WEIFEN; ZHOU, YINGSHAN. Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. *Animal Science Journal*, v. 89, n. 11, 2018, p. 1561–1571.
<https://doi.org/10.1111/asj.13089>

- [27] AL-BAADANI, HANI H.; ABUDABOS, ALAELDEIN; AL-MUFARREJ, SAUD; AL-ALI A.; ALHIDARY, IBRAHIM. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and their symbiotic effect on serum biochemical parameters in broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal Of Applied Animal Research*, v. 46, n. 1, 2018, p.1064–1072.
<https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1454325>
- [28] ABBAS, GHULAM; ASIF-IQBAL, MUHAMMAD; RIAZ, MAHAM; SAJID, MUHAMMAD; ZAHID, OSAMA; WASIM-ABBAS, SYED; SAEED, HIRA; IMRAN-RAZA, ALI; ZOHAIB, MALIK. Comparative effect of different levels of probiotics (protexin) on hemato-chemical profile in broilers. *Advances In Zoology And Botany*, v. 6, n. 3, 2018, p. 84–87.
10.13189/azb.2018.060302
- [29] CORAZZIN, MIRCO; POURNAZARI, MARYAM; AA-QOTBI, ALI; SEIDAVI, ALIREZA. Prebiotics, probiotics and thyme (*Thymus vulgaris*) for broilers: performance, carcass traits and blood variables. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, v. 30, n. 1, 2017, p. 3–10.
10.17533/udea.rccp.v30n1a01
- [30] XING, Y.; WANG, S.; FAN, J.; OSO, A.O.; KIM, S.W.; XIAO, D.; YANG, T.; LIU, G.; JIANG, G.; LI, Z.; LI, L.; ZHANG, B. Effects of dietary supplementation with lysine-yielding *Bacillus subtilis* on gut morphology, cecal microflora, and intestinal immune response of Linwu ducks. *Journal Of Animal Science*, v. 93, n. 7, 2015, p. 3449–3457.
10.2527/jas.2014-8090
- [31] CHEN, YUEPING; WEN, CHAO; ZHOU, YANMIN. Dietary synbiotic incorporation as an alternative to antibiotic improves growth performance, intestinal morphology, immunity and antioxidant capacity of broilers. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, v. 98, n. 9, 2018, p. 3343–3350.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8838>
- [32] GAO, Y.P.; MIN, Y.N.; YANG, H.L.; XU, Y.X. Effects of dietary supplementation of synbiotics on growth performance, intestinal morphology, slgA content and antioxidant capacities of broilers. *Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition*, v. 100, n. 6, 2016, p. 1073–1080.
10.1111/jpn.12479
- [33] KING, A.J.; SAKSRITHAI, KETWEE; WILLITS, N.H. Production performance of laying hens at peak lay, sulfur compounds in manure, and selected serum profiles: efficacy of *Lactobacillus* species as probiotics. *Animal Production Science*, v. 60, n. 2, 2019, p. 296–304.
10.1071/AN18724
- [34] BRINCH, K.S.; GERAERT, P.A.; JACQUIER, V.; NELSON, A.; NIELSEN, P.; RHAYAT, L.; DEVILLARD, E. *Bacillus subtilis* strain specificity affects performance improvement in broilers. *Poultry Science*, v. 96, n. 7, 2017, p. 2274–2280.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex018>
- [35] KIM, I.H.; RUDEAUX, F.; UPADHAYA, S.D. Effects of inclusion of *Bacillus subtilis* (Gallipro) to energy- and protein-reduced diet on growth performance, nutrient digestibility, and meat quality and gas emission in broilers. *Poultry Science*, v. 98, n. 5, 2019, p. 2169–2178.
<https://doi.org/10.3382/ps/pey573>
- [36] KIM, I.H.; PARK, J.H.; YUN, H.M. The effect of dietary *Bacillus subtilis* supplementation on the growth performance, blood profile, nutrient retention, and caecal microflora in broiler chickens. *Journal Of Applied Animal Research*, v. 46, n.1, 2018, p. 868–872.
<https://www.tandfonline.com/loi/taar20>
- [37] CHATTERJEE, PARESH-NATH; DAS, PARTHA-PRATIM; JAYARAMAN, SATHISHKUMAR; ROY, BARUN; SAINI, PRAKASH-CHANDRA. Use of *Bacillus Subtilis* PB6 as a potential antibiotic growth promoter replacement in improving performance of broiler birds. *Poultry Science*, v. 96, n. 8, 2017, p. 2614–2622.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex079>
- [38] GOODARZI-BOROOJENI, FARSHAD; VAHJEN, W.; MANNER, K.; BLANCH, A.; SANDVANG, D.; ZENTEK, J. *Bacillus subtilis* in broiler diets with different levels of energy and protein. *Poultry Science*, v. 97, n. 11, 2018, p. 3967–3976.
10.3382/ps/pey265
- [39] ANTHONY, R. *et al.* Guidelines for the Euthanasia of Animals. 5 ed. Illinois (United States): American Veterinary Medical Association, 2013, 121 p.

Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón obtenido de dos variedades de batata (*Ipomoea batatas*)*

Physicochemical and functional properties of almidon obtained from two varieties of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*)

Propriedades físico-químicas e funcionais do almidon obtido de duas variedades de batata (*Ipomoea batatas*)

MURILLO-MARTÍNEZ, MARÍA¹; ALVIS-BERMÚDEZ, ARMANDO²;
ARRAZOLA-PATERNINA, GUILLERMO³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 6 de Marzo 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020.

* Título del proyecto de origen: "Aprovechamiento agroindustrial de dos variedades de batata (*Ipomoea batatas*)". Financiación: Universidad de Córdoba, Convocatoria interna. Culminación: Junio 30 de 2018.

- 1 Universidad de Córdoba, Facultad de Ingenierías, Programa de Ingeniería de Alimentos, Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de vegetales. Ingeniero de Alimentos. Montería, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7071-9107>
- 2 Universidad de Córdoba, Facultad de Ingenierías, Programa de Ingeniería de Alimentos, Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de vegetales. PhD. Ingeniería. Montería, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5638-271X>
- 3 Universidad de Córdoba, Facultad de Ingenierías, Programa de Ingeniería de Alimentos, Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de vegetales. PhD. Ingeniería. Montería, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6878-0806>

Correspondencia: gsarrazola@correo.unicordoba.edu.co

RESUMEN

El cultivo y producción de la Batata en Colombia registra pocos excedentes para el mercado nacional, su rendimiento se encuentra aproximadamente en 6 t/ha, dicha producción, se centra en la región Caribe Colombiana, en los departamentos de Córdoba y Sucre; sin embargo, el cultivo de la batata podría llegar a ocupar un lugar de importancia para la industria alimentaria, por los aportes nutricionales y por su alto contenido de almidón, considerado ideal para la obtención industrial de harinas y almidones. Esta investigación estudio las propiedades fisicoquímicas y funcionales al almidón obtenido de dos variedades de batata, donde, se analizó la capacidad de absorción de agua, viscosidad máxima, temperatura de gelatinización, asentamiento, estabilidad. Previo a las determinaciones, las muestras fueron secadas hasta peso constante. Se encontró que el almidón de batata amarilla resulto ser de mejor calidad al poseer menor solubilidad, mayor absorción de agua, mayor poder de hinchamiento y mayor temperatura de gelatinización que el almidón de batata morada, mostrando valores alentadores para la industria alimentaria como espesantes, estabilizantes y gelificantes en alimentos refrigerados y congelados.

ABSTRACT

Sweet potato cultivation and production in Colombia registers few surpluses for the national market, its yield is approximately 6 t/ha, said production is centered in the Colombian Caribbean region, in the departments of Córdoba and Sucre; However, the cultivation of sweet potatoes could come to occupy an important place for the food industry, due to its nutritional contributions and its high starch content, considered ideal for the industrial production of flours and starches. This investigation studied the physicochemical and functional properties of the starch obtained from two varieties of sweet potato, where the water absorption capacity, maximum viscosity, gelatinization temperature, settling, stability was analyzed. Before the determinations, the samples were dried to constant weight. It was found that the yellow sweet potato starch turned out to be of better quality due to its lower solubility, higher water absorption, higher swelling power and higher gelatinization temperature than the purple sweet potato starch, showing encouraging values for the food industry as thickeners, stabilizers and gelling agents in refrigerated and frozen foods.

RESUMO

O cultivo e a produção de batata-doce na Colômbia registram poucos excedentes para o mercado nacional, sua produção é de aproximadamente 6 t / ha, disse que a produção está centrada na região do Caribe colombiano, nos

PALABRAS CLAVE:

Reología; Gelatinización; Absorción; Hinchamiento; Tecnofuncionales.

KEYWORDS:

Rheology; Gelatinization; Absorption; Swelling; Techofunctional.

PALAVRAS-CHAVE:

Reologia; Gelatinização; Absorção; Inchaço; Tecofuncionais.

Cómo citar este artículo: MURILLO-MARTÍNEZ, MARÍA; ALVIS-BERMÚDEZ, ARMANDO; ARRAZOLA-PATERNINA, GUILLERMO. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón obtenido de dos variedades de batata (*Ipomoea batatas*). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 117-127. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)117-127](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)117-127)

departamentos de Córdoba e Sucre; No entanto, o cultivo da batata-doce pode vir a ocupar um lugar importante para a indústria alimentícia, devido às suas contribuições nutricionais e ao seu alto teor de amido, considerado ideal para a produção industrial de farinhas e amidos. Esta investigação estudou as propriedades físico-químicas e funcionais do amido obtidas de duas variedades de batata-doce, onde foram analisadas a capacidade de absorção de água, viscosidade máxima, temperatura de gelatinização, sedimentação e estabilidade. Antes das determinações, as amostras foram secas com peso constante. Verificou-se que o amido de batata-doce amarelo resultou em melhor qualidade devido à sua menor solubilidade, maior absorção de água, maior poder de intumescimento e maior temperatura de gelatinização que o amido de batata-doce roxo, mostrando valores encorajadores para a indústria de alimentos como espessantes, estabilizadores e gelificantes em alimentos refrigerados e congelados.

INTRODUCCIÓN

La batata (*Ipomea batatas* Lam.) pertenece al grupo de raíces y tubérculos, conocidos por ser fuentes principales de carbohidratos de gran aporte calórico (almidón), sin dejar de lado la presencia en su composición de otros nutrientes [1] Las características de la batata como cultivo resistente, la convierten en un actor principal de la seguridad alimentaria, en cuanto a disponibilidad, accesibilidad, estabilidad y utilización. Alrededor de 105 millones de toneladas de este alimento se produjeron en el mundo en 2016 [2].

En la actualidad existen muchas variedades de batata, las cuales se diferencian dependiendo de sus atributos físicos y químicos, un ejemplo de esto es la gran cantidad de betacaroteno presente en la batata de pulpa naranja o amarilla, este atributo ha ocasionado un aumento en la demanda de este tipo de batata, particularmente en la industria de alimentos donde se utiliza como ingrediente para productos de panadería, aperitivos, espesantes y de confitería el cual ha llevado a una creciente demanda e interés por este tipo de batata [3] A su vez puede transformarse en harina para una vida útil más larga [4].

Otro componente importante que posee la batata es el almidón, fuente de energía importante en la dieta humana. Con el inicio de la industria de alimentos procesados se dio paso a la necesidad de disponibilidad de almidón puro y por ende al crecimiento en el uso de estos [5]. La utilidad del almidón en formulaciones y aplicaciones industriales depende de las siguientes propiedades: gelatinización, retrogradación; solubilidad, hinchamiento, absorción de agua, sinéresis y comportamiento reológico de sus pastas y geles, por lo anterior se hace necesario conocer las propiedades funcionales, debido a que las investigaciones referentes a las raíces como camote, ñampí (Malanga), ñame y yuca aún se encuentran en etapa inicial [6].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón obtenido a partir de las variedades de batata morada pulpa blanca y amarilla pulpa naranja (*Ipomea batatas*).

MÉTODO

Recolección de las muestras

10 kg de batatas fueron obtenidas en el mercado público del sur de Montería (Córdoba- Colombia), 5 kg de batata amarilla y 5 kg de batata morada, localizado geográficamente en la coordenada, 8°44'34" Norte y 75° 53'14" Oeste a 20 msnm, temperatura promedio de 28°C y humedad relativa de 85%, libres de daños mecánicos y de microorganismos, las batatas fueron suministradas por un mismo proveedor, con el objetivo de minimizar la posibilidad de mezclas varietales, siendo escogidas las raíces de batata tipo morada con la mayor homogeneidad posible en tamaño, madurez y peso.

Extracción de almidón de batata

El almidón se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por [7] en la cual las muestras de las dos variedades de batata (amarilla y morada) fueron peladas, cortadas en cubos de aproximadamente 3 cm y sumergidos por 30 minutos en solución de Bisulfito de Sodio (NaHSO_3) (1500 ppm, 1:3 (p/v)). Posteriormente los cubos fueron triturados durante 2 minutos en una licuadora industrial y la masa resultante se mezcló en recipientes que contenían solución de NaHSO_3 (1500 ppm de SO_2 , 1:1 (v/v)). Seguidamente la lechada de almidón se filtró para eliminar la fibra y se dejó en reposo para sedimentación a 4°C por 4 horas. Luego el líquido sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó 3 veces con agua destilada, centrifugando en el último lavado a 2500 rpm, por 12 minutos con la finalidad de recuperar el almidón. Posteriormente, se secó en una estufa a 55°C, durante 24 horas para posterior molienda en el equipo Pulverisette 16 hasta que se obtuvo un polvo (malla 100), luego se almacenó en frascos de vidrio con cierre de tapa hermética hasta su uso.

Caracterización fisicoquímica del almidón

Se evaluó la composición fisicoquímica del almidón obtenido a partir de las variedades de batata morada y amarilla de acuerdo a la metodología descrita por [8]. Se evaluaron las siguientes propiedades: humedad (AOAC 925.10), cenizas (AOAC 923.03), grasa bruta (AOAC 920.85), proteína bruta (AOAC 920.87), y fibra bruta (AOAC 985.29).

Los carbohidratos totales fueron obtenidos mediante diferencia de los datos reportados en el análisis proximal, tal como se muestra en la Ecuación 1.

$$(\%)CHOS = 100 - (\%)Hum. - (\%)Pro. - (\%)Gra. - (\%)Fib. - (\%)Cen. \quad (\text{Ec. 1})$$

La energía se calculó utilizando los factores de conversión de Atwater, como se muestra en la Ecuación 2.

$$\text{Calorías} \left(\frac{\text{Kcal}}{100\text{g}} \right) = (4 * \%pro.) + (9 * \%gra.) + (4 * \%chos) \quad (\text{Ec. 2})$$

Caracterización funcional del almidón

Se ejecutaron los siguientes ensayos: Índice de absorción de agua (IAA), índice de solubilidad en agua (ISA) y poder de hinchamiento (PH): utilizando la técnica escrita por [9] la cual consistió en agregar 1,25 g de la muestra de almidón de batata a los tubos de centrifuga seco, más 30 mL de agua destilada precalentada a 60°C, se procedió a agitación y después se llevaron los tubos a baño maría por 30 minutos a 60°C, la agitación de la suspensión se comenzó a los 10 minutos de iniciado el calentamiento. Seguidamente se centrifugaron a 4900 RPM por 30 minutos a temperatura ambiente, se separó el sobrenadante y midió el volumen en una probeta graduada, luego se tomaron 10 mL del sobrenadante, se adicionaron en un vaso de precipitado y se secó el sobrenadante en un horno a 70°C. Finalmente, se pesó el tubo de centrifuga con el gel y el vaso de precipitado con los insolubles en una balanza analítica. Para la determinación del IAA, ISA y PH se utilizaron las ecuaciones 3, 4 y 5.

$$IAA = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$ISA = \frac{\text{Peso solubles (g)} \times V \times 10}{\text{Peso muestra (g)}} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$PH = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g)} - \text{Peso solubles (g)}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Temperatura de gelatinización

Se utilizó la técnica descrito por [10], la cual consistió en adicionar 10 g de almidón de batata en un frasco volumétrico, disolver y completar con agua destilada hasta 100 mL, seguidamente se tomaron 50 mL de la suspensión de almidón de batata y se agregaron a un vaso de precipitado de 100 mL, se calentó en baño maría a 85°C y se agitó de manera constante la suspensión de almidón hasta la formación de una pasta en conjunto con una temperatura estable. La temperatura de gelatinización se determinó directamente del termómetro.

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, al momento de encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) se compararon mediante una prueba t-student.

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica del almidón de batata morada y amarilla.

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica del almidón de batata morada y amarilla se muestran en el Cuadro 1.

Análisis de Humedad

Los valores obtenidos de la humedad del almidón de batata morada y de batata amarilla fueron 10,95% y 10,91% respectivamente, valores muy cercanos a otros reportados en 5,50-19,14% [11], pero superiores a 3,86-6,52% [7], 7,34% [12], 8,03% [1] y 9,83% [13].

Esta diferencia de resultados puede obedecer a que la humedad depende del método utilizado y de las condiciones de deshidratación utilizadas [14]. Valores de humedad superiores al 13% puede ocasionar daño microbiano y por lo tanto, el deterioro en la calidad del polímero [12].

Para porcentaje de humedad, se describen valores para otros tipos de tubérculos y raíces como almidón de ñame (8,98%), almidón de yuca (9,12%) reportados por [1]; almidón de ñame (8,66-10,22%) y almidón de yuca

Cuadro 1. Composición fisicoquímica del almidón de batata*

Variables	Almidón batata morada	Almidón batata amarilla
Humedad (%)	10,95 ± 0,49 ^a	10,91 ± 0,13 ^a
Cenizas (%)	0,32 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,05 ^a
Fibra cruda (%)	0,43 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,04 ^a
Proteína (%)	0,38 ± 0,04 ^a	0,34 ± 0,08 ^a
Grasa (%)	0,46 ± 0,29 ^a	0,20 ± 0,10 ^a
Carbohidratos totales (%)	87,35 ± 0,69 ^a	87,69 ± 0,18 ^a
Energía (Kcal/100 g almidón)	355,99 ± 5,34 ^a	353,91 ± 1,34 ^a
*Letras iguales en la misma fila no denotan diferencia estadística significativa ($P > 0,05$).		

(7,80–8,47%) [15]; almidón de yuca (9,48%) y almidón de papa (19%) [7]. Como se observa en el Cuadro 1, los porcentajes de humedad del almidón de batata morada y amarilla obtenidos son superiores a los porcentajes del almidón de ñame y yuca e inferiores al almidón de papa.

Análisis de Cenizas

Los reportes del contenido de cenizas del almidón de batata morada y amarilla fueron 0,32 y 0,38% respectivamente, demostrando que son acordes con los reportados por otros autores, para almidón de batata (0,10–0,47%) [7], (0,31%) [12] y (0,26%) [13].

El porcentaje de cenizas reportado en la literatura para otros tipos de tubérculos y raíces como, el almidón de ñame (0,40%), almidón de yuca (2,1%), almidón de papa (0,40 %) reportado por [16]; almidón de papa (0,27–0,86%) obtenido por [7]; almidón de ñame (0,36%), almidón de yuca (0,34%) y almidón de papa (0,44%) reportados por [15], valores cercanos a los obtenidos para almidón de batata en esta investigación.

Análisis de Fibra Cruda

En el cuadro 1 se presentan los resultados del porcentaje de fibra cruda del almidón de batata morada y amarilla, cuyos valores fueron de 0,43 y 0,47% respectivamente, estos valores son superiores al reportado por [7] (0,28%). Además, otros autores muestran para fibra cruda estudios para otros tipos de tubérculos y raíces, para almidón de yuca (0,05 %) y almidón de papa (0,05 %) [15] y almidón de ñame (0,22 %) [17], valores por debajo de los reportados para almidón de batata en esta investigación. El % de fibra es importante ya que ayuda a mantener el corazón sano y ayuda a la liberación lenta y sostenida de la energía, lo cual ayuda a mantener estable los niveles de azúcar en sangre a lo largo del día y al control del estreñimiento.

Análisis de Proteína

Los reportes del contenido de proteína del almidón de batata morada y amarilla fueron 0,38 y 0,34% respectivamente demostrando que están acordes con los reportados por otros autores para almidón de batata, (0,28–0,75%) [12] y cercanos a 0,37% [13] y superior a 0,22% [7] quienes afirman que el contenido de proteína es determinante en las características estructurales y funcionales de los almidones, condicionando el uso de estos en la industria alimentaria.

El porcentaje de proteína reportado en la literatura para otro tipo de tubérculos y raíces como, almidón de ñame es de 0,86% [1], almidón de ñame 0,80% [18], almidón de yuca 0,60% y almidón de papa (0,62 %) [15], valores superiores a los que se encontraron para almidón de batata en esta investigación.

Análisis de Grasa

En el cuadro 1 se presentan los resultados del porcentaje de grasa del almidón de batata morada y amarilla, cuyos valores fueron de 0,46 y 0,20% respectivamente, estos valores son superiores al reportado por [7] (0,28%). Los datos del contenido de grasa del almidón de batata morada y amarilla, son inferiores a otros reportados 0,52% [1].

El contenido de grasas reportado en literatura para otros tipos de tubérculos y raíces, para almidón de yuca (0,12 %) y almidón de ñame (0,22%) [1]; almidón de yuca (0,30–0,32%) y almidón de papa (0,35 %) [15] y almidón de yuca (0,20 %) y almidón de papa (0,05 %) [7], valores inferiores al obtenido en esta investigación para almidón de batata morada, pero similares con respecto al obtenido para almidón de batata amarilla.

Análisis de Carbohidratos Totales

En cuanto al contenido de carbohidratos totales del almidón de batata morada y amarilla fueron de 87,35 y 87,69%, los cuales concuerdan con los reportados para almidón de batata con 80-90% [19], 90% [20], 98,11% [14] y 90,4% [21].

El contenido de carbohidratos totales reportado en literatura para otros tipos de tubérculos y raíces, son 81% para almidón de ñame [18], 66,7% para almidón de papa, 72,8% para almidón de ñame y 86,9% para almidón de yuca [1], valores inferiores a los obtenidos para almidón de batata en esta investigación.

Análisis de Calorías

En el cuadro 1 se presentan los resultados del porcentaje de calorías del almidón de batata morada y amarilla, cuyos valores fueron de 355,99 y 353,91 kcal/100 g respectivamente, concuerdan con los 351 Kcal/100 g almidón de batata [1]; estos autores también reportaron valores de aporte calórico de 318 Kcal/100 g en almidón de ñame, 364 Kcal/100 g en almidón de yuca y 316 Kcal/100 g en almidón de papa, observando así que los resultados reportados en literatura para almidón de ñame y papa son inferiores a los obtenidos para almidón de batata, por otro lado el almidón de yuca reporta un aporte calórico mayor al del almidón de batata obtenido en el presente estudio.

Las calorías permiten que el organismo desarrolle funciones elementales como digerir los alimentos y mantener la temperatura corporal. Asimismo, entregan compuestos esenciales para el funcionamiento adecuado de los órganos y del sistema inmune.

Caracterización funcional del almidón de batata morada y amarilla

En el Cuadro 2 se relacionan los resultados obtenidos de la caracterización funcional del almidón de batata morada y amarilla.

Índice de absorción de agua (IAA) solubilidad en agua (ISA) y Poder de hinchamiento (PH)

Se tiene que el índice de absorción de agua (IAA) del almidón de batata morada y amarilla tuvieron valores de 1,91 y 1,72 g_{gel}/g, valores superiores a los reportados con 0,45 y 1,15 g_{gel}/g almidón de batata [11]. La cantidad de agua retenida en los gránulos de almidón está relacionado con el contenido de proteína y carbohidratos, estos autores reportaron valores entre 2,95 a 7,20 g_{gel}/g almidón de batata, valores superiores a los obtenidos en el presente estudio [20]. Con respecto a la literatura para otros tipos de tubérculos y raíces, en almidón de ñame con 2,65 g_{gel}/g almidón [18], en almidón de papa 5,83 g_{gel}/g almidón [15] y en almidón de yuca 0,82–15,52% [22], valores superiores a los obtenidos para almidón de batata en esta investigación.

Con relación al índice de solubilidad en agua (ISA) del almidón de batata morada y amarilla cuyos valores fueron de 2,91 y 0,92% respectivamente, son inferiores a los reportados por (7–16% en almidón de batata); (8,56 a 19,97%). La solubilidad del almidón dependerá de una serie de factores tales como la fuente de extracción [23], las fuerzas inter-asociativas entre sus moléculas, el poder de hinchamiento y la presencia de otros componentes. Se reporta

Cuadro 2. Composición funcional del almidón de batata*

Variables	Almidón batata morada	Almidón batata amarilla
Índice de absorción de agua (IAA) (g agua/g almidón)	1,91 ± 0,28 ^a	1,72 ± 0,02 ^a
Índice de solubilidad en agua (ISA) (%)	2,91 ± 0,74 ^a	0,92 ± 0,45 ^b
Poder de hinchamiento (PH) (%)	1,93 ± 0,29 ^a	1,73 ± 0,02 ^a
Temperatura de Gelatinización (°C)	76,67 ± 2,31 ^a	76,33 ± 3,21 ^a

*Letras diferentes en la misma fila denotan diferencia estadística significativa (P<0,05).

para otras raíces y tubérculos como almidón de yuca 0,27–12,32% [22], almidón de papa 4,8-7,5% [25] y almidón de ñame 0,59-1,92% [17], valores cercanos a los obtenidos para almidón de batata en esta investigación.

Respecto al poder de hinchamiento, los valores obtenidos con (PH) del almidón de batata morada y amarilla presentaron valores de 1,93 y 1,73%, son inferiores a los reportados para almidón de batata (8,79- 9,11%) [11]. Las diferencias en el poder de hinchamiento de los almidones de batata podrían atribuirse a las variaciones en las fuerzas de unión asociativa dentro de los gránulos de almidón. Con respecto a lo reportado en literatura para otros tipos de tubérculos y raíces, se tiene para almidón de papa criolla 11,4% , almidón de ñame 2,66% [18] y almidón de yuca 0,79-15,45% [22], valores superiores a los obtenidos para almidón de batata en esta investigación. Una baja solubilidad, alta absorción de agua y un alto poder de hinchamiento son almidones de buena calidad y los almidones de batata, posee estas características.

Temperatura de gelatinización

Los resultados obtenidos de la temperatura de gelatinización del almidón de batata morada y amarilla (Cuadro 2) cuyos valores son 76,67 y 76,33 °C, son cercanos a otros reportados por Abegunde et al; acosta y Blanco, Velásquez y Quintero quienes reportaron valores de 62,54–75,9°C [12], 78,50°C [1] y mayor de 61,3°C [7].

Autores como Aristizabal *et al.*; Cerón-Lasso *et al.*; Salcedo *et al.*; muestran que la temperatura de gelatinización del almidón de yuca se encuentra en el rango 57,5–70°C [22], para almidón de papa 62°C [26] siendo inferiores a los valores obtenidos en esta investigación y almidón de ñame 83–84,2°C [17], los cuales son superiores al obtenido para almidón de batata morada y amarilla. Una mayor temperatura de gelatinización en almidones nativos, refleja una mayor estabilidad interna del gránulo de almidón, normalmente asociada a una mayor presencia de zonas semicristalinas [1,27,28,29,30].

En virtud de que las propiedades funcionales mostradas por los almidones nativos de los tubérculos tropicales fueron en algunos casos mejores al tradicional almidón de maíz, pero similares a las reportadas para las mismas variedades cultivadas en otra parte del mundo, la importancia de este trabajo radica en revalorar aquellos cultivos, como los tubérculos tropicales (batata), que, por diversas razones, han sido poco estudiadas, pero que por sus componentes tienen un prometedor potencial de explotación. Particularmente, el elevado contenido de almidón presente y la gran versatilidad de propiedades fisicoquímicas y funcionales encontradas para este polisacárido, hacen posible la utilización de los recursos naturales de la región, con la finalidad de contar con alternativas propias que permitan evitar, en lo posible, la dependencia del exterior de estos ingredientes alimentarios.

CONCLUSIONES

En la caracterización fisicoquímica del almidón de batata morada y amarilla no se encontraron diferencias significativas según la prueba t-student ($p > 0,05$) en cuanto al contenido de humedad (10,95 y 10,91%); cenizas (0,32 y 0,38%); fibra cruda (0,43 y 0,47%); proteína (0,38 y 0,34%); grasa (0,46 y 0,20%), carbohidratos totales (87,35 y 87,69%); calorías (355,99 Kcal/100 g almidón y 353,91 Kcal/100 g almidón)

El almidón obtenido de batata amarilla presentó mejor calidad con mayor contenido de almidón con respecto al almidón de batata morada, ya que obtuvo una baja solubilidad, alta absorción de agua y un alto poder de hinchamiento en su caracterización funcional. La temperatura de gelatinización de los almidones de batata morada (76,67 °C) y amarilla (76,33 °C), pueden ser usados en productos que requieran altas temperaturas, tales como los productos enlatados, alimentos para bebés, entre otros.

REFERENCIAS

- [1] ACOSTA-DELGADO, ANNIE-PAULINA; BLANCO-SANTANDER, CATHERINE. Obtención y caracterización de almidones nativos colombianos para su evaluación como posibles alternativas en la industria alimentaria [Tesis Ingeniero de Alimentos]. Cartagena (Colombia): Universidad de Cartagena, 2013. 273 p.
- [2] LESE, VILIAMU; HOLLAND, ELISABETH; WAIRIU, MORGAN; HAVEA, ROBIN; PATOLO, SOANE; NISHI, MINORU; HOPONOA, TANIELA; BOURKE, MICHAEL; DEAN, ANNIKA; WAQAINABETE, LOGOTONU. Facing food security risks: The rise and rise of the sweet potato in the Pacific Islands. *Journal of Global Food Security*, v. 18, 2018, p. 48-56.
<https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.07.004>
- [3] WANG, LIN; ZHAO, YING; ZHOU, QING; LUO, CHUN-LI; DENG, AI-PING; ZHANG, ZI-CHENG; ZHANG, JIU-LIANG. Characterization and hepatoprotective activity of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8). *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 25, n. 3, 2016, p. 607-618.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.009>
- [4] KOLAWOLE, FAUSAT; AKINWANDE, BOLANLE; ADE-OMOWAYE, BEATRICE. Physicochemical properties of novel cookies produced from orange-fleshed sweet potato cookies enriched with sclerotium of edible mushroom (*Pleurotus tuberregium*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, v. 19, n. 2, 2020, p. 174-178.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.09.001>
- [5] SOLARTE-MONTUFAR, JUAN G.; DIAZ-MURANGA, ANDERSON E.; OSORIO-MORA OSWALDO; MEJIA-ESPAÑA, DIEGO F. Propiedades reológicas y funcionales del almidón procedente de tres variedades de papa criolla. *Información Tecnológica*, v. 30, n. 6, 2019, p. 35-44.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600035>
- [6] GRANADOS, CLEMENTE; GUZMÁN, LUIS-ENRIQUE; ACEVEDO, DIOFANOR; DÍAZ, MARÍA; HERRERA, ANA. Propiedades funcionales del almidón de Sagu (*Maranta arundinacea*). *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 12, n. 2, 2014, p. 90-96.
- [7] VELÁSQUEZ-HERRERA, JULIAN-DAVID; LUCAS-AGUIRRE, JUAN-CARLOS; QUINTERO-CASTAÑO, VÍCTOR-DUMAR. Physical-chemical characteristic determination of potato (*Solanum phureja* Juz y Bukasov) starch. *Acta Agronómica*, v. 66, n. 3, 2017, p. 323-330.
<https://doi.org/10.15446/acag.v66n3.52419>
- [8] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. (USA): 1990.
- [9] ANDERSON, R.A.; CONWAY, H.F.; PHEISER, V.F.; GRIFFIN, L. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*, v. 14, 1969, p. 4-12.
<https://doi.org/10.1002/star.19700220408>
- [10] GRACE M.R. Elaboración de la yuca. Roma (Italia): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 1977 116, p.
- [11] MANZANILLAS-ROJAS, LISBETH-ADELA. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de féculas de tres variedades de camote (*Ipomoea batata*) para aplicaciones alimentarias [Tesis Ingeniería de Alimentos]. Ambato (Ecuador): Universidad Técnica de Ambato, 2018, 168 p.
- [12] ABEGUNDE, OLUWASEYI-KEMI; MU, TAI-HUA; CHEN, JING-WANG; DENG, FU-MING. Physicochemical characterization of sweet potato starches popularly used in Chinese starch industry. *Food Hydrocolloids*, v. 33, n. 1, 2013, p. 169-177.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.005>
- [13] GONZÁLEZ, A., OLGUÍN, N., LOAYZA, E.; SEVERICH, E. Almidón Nativo y Modificado. Obtención, cuantificación, modificación y usos [En línea]. 2014. Disponible: <http://www.dui.uagrm.edu.bo/Informacion/InvestigacionesCHI/6-chi-2014.pdf>. [Acceso: 29 de enero de 2019].
- [14] MEDINA-GARCÍA, LUÍS. Obtención de maltodextrinas por vía enzimática a partir de almidón de camote (*Ipomoea batatas*) [Tesis Maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable]. Jiquilpan (México): Instituto Politécnico Nacional, 2013.

- [15] ALVIS, ARMANDO; VÉLEZ, CARLOS A.; VILLADA, HÉCTOR S.; RADA-MENDOZA, MAITE. Análisis Físico-Químico y Morfológico de Almidones de Ñame, Yuca y Papa y Determinación de la Viscosidad de las Pastas. *Información Tecnológica*, v. 19, n. 1, 2008, p.1928.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642008000100004>
- [16] LEIVA-LÓPEZ, CORALIA-MERCEDES; OBANDO-PÉREZ, RAYZA-SOLANGE. Extracción de almidón a partir de variedades de papa cultivadas en Nicaragua [Tesis Ingeniero Químico]. Managua (Nicaragua): Universidad Nacional de Ingeniería, 2014, 60 p.
- [17] SALCEDO, JAIRO-GUADALUPE; GARCÍA-MOGOLLÓN, CARLOS; SALCEDO-HERNÁNDEZ, DAVID. Propiedades funcionales de almidones de ñame (*Dioscorea alata*). *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, v. 16, n. 2, 2018, p. 99-107.
<http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v16n2.1170>
- [18] ACUÑA-PINTO, HAROLD-MAURICIO. Extracción, caracterización y aplicación de almidón de ñame variedad blanco (*Dioscorea trifida*) originario de la región amazónica colombiana para la elaboración de productos horneados [Tesis Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2012, 64 p.
- [19] PANDI, J.; GLATZ, P.; FORDER, R.; AYALEW, W.; WARAMBOI, J.; CHOUSALKAR, K. The use of sweet potato (*Ipomoea batatas*, L) root as feed ingredient for broiler finisher rations in Papua New Guinea. *Animal Feed Science and Technology*, v. 14, 2016, p.1-11.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2016.01.011>
- [20] SHEKHAR, SHUBHENDU; MISHRA, DIVYA; BURAGOHAIN, ALAK-KUMAR; CHAKRABORTY, SUBHRA; CHAKRABORTY, NIRANJAN. Comparative analysis of phytochemicals and nutrient availability in two contrasting cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Food Chemistry*, v. 173, 2015, p. 957-965.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.172>
- [21] TORTOE, CHARLES; AKONOR, PT.; KOCH, KRISTINE; MENZEL, CAROLIN. Physicochemical and functional properties of flour from twelve varieties of Ghanaian sweet potatoes. *International Food Research Journal*, v. 24, n. 6, 2017, p. 2549-2556.
- [22] ARISTIZÁBAL, JOHANNA; SÁNCHEZ, TERESA; MEJÍA-LORIO, DANILO. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. *Boletín de servicios agrícolas de la FAO*, 163. Roma (Italia): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2007, p. 66-74.
- [23] NARAYANA-MOORTHY, NUBRAMONY. Physicochemical and Functional Properties of Tropical Tuber Starches: A Review. *Journal Starch - Starke*, v. 54, n. 12, 2002, p. 559-592.
<https://doi.org/10.1002/1521-379X>
- [24] ZHU, FAN. Isolation, composition, structure, properties, modifications, and uses of yam starches. *Comprehensive review in food science and food safety*, v. 14, 2015, p. 257-386.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12134>
- [25] MARTÍNEZ, P.; MÁLAGA, A.; BETALLELUZ, I.; IBARZ, A.; VELEZMORO, C. Caracterización funcional de almidones nativos obtenidos de papas (*Solanum phureja*) nativas peruanas. *Revista Scientia Agropecuaria*, v. 6, n. 4, 2015, p. 291-301.
[10.17268/sci.agropecu.2015.04.06](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.06)
- [26] CERON-LASSO, MARÍA; ALZATE ARBELAEZ, ANDRÉS F.; ROJANO, BENJAMÍN A.; ÑUSTEZ-LÓPEZ, CARLOS E. Composición Físicoquímica y Propiedades Antioxidantes de genótipos nativos de papa criolla (*Solanum tuberosum* grupo *phureja*). *Información Tecnológica*, v. 29, n. 3, 2018, p. 205-216.
<http://dx.doi.org/10.4067/S071807642018000300205>
- [27] IESE, VILIAMU; HOLLAND, ELISABETH; WAIRIU, MORGAN; HAVEA, ROBIN; PATOLO, SOANE; NISHI, MINORU; HOPONOA, TANIELA; BOURKE, MICHAEL; DEAN, ANNIKA; WAQAINABETE, LOGOTONU. Facing food security risks: The rise and rise of the sweet potato in the Pacific Islands. *Global Food Security*, v. 18, 2018, p. 48-56.
<https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.07.004>

- [28] LOW, J.; BALL, A.M.; MAGEZI, S.; NJOKU, R.; MWANGA, M.; ANDRADE, M.; TOMLINS, K.; DOVE, R.; VAN MOURIK, R.D. Sweet potato development and delivery in sub-Saharan África. *African Scholarly Science*, v. 17, n. 02, 2017, p. 11955-11972.
10.18697/ajfand.78.HarvestPlus07
- [29] LEBOT, VINCENT. Rapid quantitative determination of maltose and total sugars in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. [Lam.]) varieties using HPTLC. *Journal of Food Science and Technology*, v. 54, n. 3, 2017, p. 718–726.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2510-2>
- [30] NGOMA, KHUTHADZO; MASHAU, MPHU; SILUNGWE, HENRY. Physicochemical and Functional Properties of Chemically Pretreated *Ndou* Sweet Potato Flour. *International Journal of Food Science*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/4158213>

Rizobios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil*

Native rhizobia efficient in nitrogen fixation in *Leucaena leucocephala* in Rio Grande do Sul, Brazil

Rizóbios autóctones eficientes na fixação de nitrogênio em *Leucaena leucocephala* no Rio Grande do Sul, Brasil

CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO¹; DA SILVA-ARAUJO, FERNANDA²;
SACCOL-DE SÁ, ENILSON-LUIZ³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 23 de Marzo 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

- * Título del proyecto de origen: "Aplicação conjunta de substâncias húmicas e co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense* em leguminosas e gramíneas", Registro SISGEN AEA14C9. Financiación: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Culminación: 26 de junio de 2020.
- 1 Universidad Popular del Cesar, Departamento de Microbiología. Doctor en Ciencia del Suelo. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3391-420X>
 - 2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Mestranda em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-6247-3079>
 - 3 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo. Doutor em Ciência do Solo. Porto Alegre, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-7796-0857>

Correspondencia: juancubillos@unicesar.edu.co

Cómo citar este artículo: CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO; DA SILVA-ARAUJO, FERNANDA; SACCOL-DE SÁ, ENILSON-LUIZ. Rizobios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 128-138. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)128-138](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)128-138)

RESUMEN

La selección de rizobios nativos fijadores de nitrógeno (N) es importante para la producción de leucaena utilizada en la producción pecuaria. En el estado de Rio Grande do Sul (RS), Brasil es escasa la información de cepas nativas de rizobios con capacidad simbiótica con plantas de leucaena. El objetivo de este trabajo fue seleccionar rizobios nativos, eficientes en la fijación biológica de N en plantas de leucaena en RS. Se tomaron muestras de suelo y nódulos en diferentes localidades de RS, luego se utilizaron semillas de leucaena para obtener nódulos que fueron procesados en medios de cultivo para la obtención de los aislamientos. Se realizó un experimento en condiciones de invernadero para evaluar la eficiencia de los rizobios, mediante la determinación de la masa seca de la parte aérea (MSPA), masa seca de la raíz, número de nódulos y N acumulado de las plantas. Se seleccionaron los aislamientos de rizobios Leu01 y Leu02 como eficientes en la fijación de N por proporcionar aumento de la MSPA y acumulo de N en las plantas de leucaena similar al tratamiento control que recibió N mineral. Por tanto, estos aislamientos podrían ser promisorios en futuros estudios en invernadero y campo de esta leguminosa.

ABSTRACT

The selection of native rhizobia nitrogen (N)-fixing is important for the production of leucaena used in livestock production. In the state of Rio Grande do Sul (RS), Brazil there is little information of native isolates of rhizobia with symbiotic capacity with leucaena plants. The objective of this research was to select native rhizobia, efficient in the biological N fixation in leucaena plants in RS state. Soil and nodule samples were taken at different locations in RS, then leucaena seeds were used to obtain nodules that were processed in culture media to obtain the isolates. An experiment under greenhouse conditions was conducted to evaluate the efficiency of rhizobia isolates. The dry shoot dry mass (SDM), dry mass of the root, number of nodules and the N accumulated N of the plants were determined. The isolates of rhizobia Leu01 and Leu02 were selected as efficient in N fixation because they provide increase in MSPA and an accumulation of N in leucaena plants similar to the control treatment that received N mineral. These isolates could be promising in future greenhouse and field studies of this legume.

RESUMO

A seleção de rizóbios autóctones fixadores de nitrogênio (N) é importante para a produção de leucena utilizada para a produção pecuária. No estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, existem poucas informações sobre isolados de rizóbios autóctones com capacidade simbiótica com plantas de leucena. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de rizóbios autóctones, eficientes na fixação biológica de nitrogênio em plantas de leucena no estado do RS. Foram coletadas amostras de solo e nódulos em diferentes locais do RS e, logo foram utilizadas sementes de leucena para obter os nódulos que em seguida foram processados em meios de cultura para obtenção dos isolados. Foi conduzido um experimento em casa de vegetação para avaliar a eficiência dos isolados de rizóbios, determinando-se a massa seca da parte

PALABRAS CLAVE:

Simbiosis; Leguminosas; Promoción de crecimiento vegetal.

KEYWORDS:

Symbiosis; Legumes; Plant growth promotion.

PALAVRAS-CHAVE:

Simbioses; Leguminosas; Promoção de crescimento vegetal.

aérea, massa seca da raiz, número de nódulos e nitrogênio acumulado nas plantas. Foram selecionados os isolados de rizóbios Leu01 e Leu02 como eficientes na fixação de N por proporcionarem o aumento da MSPA e acúmulo de N nas plantas de leucaena, semelhante ao tratamento controle não inoculado que recebeu fertilização nitrogenada, sendo estes isolados considerados como promissores que poderiam ser utilizados em outros estudos em casa de vegetação e campo desta leguminosa.

INTRODUCCIÓN

La producción animal, principalmente la ganadería, es una de las actividades más importante en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil, siendo los pastos nativos la base para la alimentación animal. La necesidad de incrementar la producción de alimentos para la producción animal ha permitido el estudio de leguminosas como *Leucaena leucocephala* por su versatilidad, siendo utilizada como forraje, asociada con pastos y otros cultivos anuales, el desarrollo de sistemas silvopastoriles y agroforestales, el control de maleza por alelopatía, la recuperación de áreas degradadas y reforestación en suelos tropicales [1,2,3,4,5,6,7].

En el Estado de Rio Grande do Sul, debido a las condiciones subtropicales como las bajas temperaturas en el invierno y la acidez de los suelos, se han realizado estudios sobre el crecimiento y supervivencia de especies y accesiones de leucaena, dentro de las cuales se encuentra *Leucaena leucocephala*; determinándose una tasa alta de crecimiento y sobrevivencia a las condiciones edafoclimáticas del sur de Brasil, siendo reportada como una de las especies de mayor potencial para ser cultivada [8].

Por otra parte, algunos estudios demuestran que *L. leucocephala* posee la capacidad de establecer asociación simbiótica con diversos géneros de rizobios como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* con capacidad de fijar N [3,9,10,11] a través de la formación de estructuras conocidas como nódulos que facilitan la captación de N atmosférico por medio de la fijación biológica de N.

En Brasil, existen cepas de rizobios que se encuentran en la colección SEMIA del Departamento de Diagnóstico e Investigación Agropecuaria (DDPA), recomendadas para leucaena y liberadas para la producción de inoculantes por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Abastecimiento (MAPA) de Brasil. Sin embargo, en el estado de Rio Grande do Sul no se han desarrollado estudios de aislamiento y selección de rizobios nativos, adaptadas a las condiciones subtropicales y capaces de establecer asociación simbiótica con leucaena.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue seleccionar rizobios nativos en el estado de Rio Grande do Sul simbioses de leucaena, eficientes en la fijación biológica de nitrógeno que puedan ser utilizados como inoculantes en los sistemas de producción agropecuaria.

MÉTODO

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Suelos y en el invernadero del Departamento de Suelos de la Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Se tomaron muestras de suelo en diferentes lugares de las zonas rurales del estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Cuadro 1). El muestreo se realizó a juicio a una profundidad de 0 a 20 cm, considerándose la presencia de plantas leguminosas nativas o introducidas. Adicionalmente, fueron recolectados nódulos de plantas de *Desmodium sp* en la Estación Experimental Agronómica (EEA) de la UFRGS en el municipio Eldorado do Sul.

Aislamiento y caracterización de rizobios

Las muestras de suelo fueron recolectadas y transportadas al Laboratorio de Microbiología del Suelo y posteriormente se colocaron 10 g de cada muestra en 90 mL de solución salina al 0,85%, manteniéndose en agitación durante tres horas.

Cuadro 1. Localización de las muestras recolectadas.

Muestra	Lugar	Latitud (S)	Longitud (O)	Leguminosa predominante en el área
1	Eldorado do Sul - RS	30°5'19.03"	51°40'28.21"	<i>Desmodium</i> sp.
2	Eldorado do Sul - RS	30°5'16.75"	51°40'29.24"	<i>Desmodium</i> sp.
3	Eldorado do Sul - RS	30°6'58.50"	51°39'57.98"	Bracatinga (<i>Mimosa</i> sp)
4	Porto Alegre - RS	30°4'15.87"	51°8'20.55"	Leucaena (<i>Leucaena leucocephala</i>)
5	Viamão - RS	30°7'43.57"	51°4'4.44"	Maricá (<i>Mimosa bimucronata</i>)
6	Viamão - RS	30°7'51.18"	51°3'58.67"	Inga (<i>Inga marginata</i>)
7	Viamão - RS	30°7'50.46"	51°4'0.46"	Arbórea sem identificar

Para el aislamiento de rizobios a partir del extracto de suelo se instaló un experimento, utilizando como trampa semillas de plantas de leucaena recolectadas en campo para obtener nódulos. Estas semillas fueron escarificadas con papel de lija No. 100 durante 1 minuto y posteriormente desinfectadas por inmersión sucesiva en alcohol al 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 2,5% durante 30 segundos e inmediatamente se enjugaron seis veces consecutivas con agua destilada estéril [12]. Luego, las semillas se sembraron por separado en vasos plásticos que contenían una mezcla de vermiculita y arena (2:1) e inmediatamente se realizó la adición de 2 mL de la suspensión líquida de las muestras de suelo en cada vaso, utilizándose 5 repeticiones para cada muestra. Los vasos fueron regados con la solución nutritiva Sarruge [13], para mantener a las plántulas durante el experimento en condiciones de laboratorio.

Transcurridos 45 días después de adición de la suspensión de suelo, se realizó la separación de los nódulos de las raíces de las plántulas de leucaena y posteriormente se desinfectaron, utilizándose la misma metodología descrita anteriormente [12]. Posteriormente, en cabina de flujo laminar los nódulos fueron macerados por separado con un bastón de vidrio en tubos de ensayo estériles. La suspensión obtenida de los nódulos macerados se inoculó en placas de Petri con medio de cultivo de levadura manitol con rojo congo (LMR) en cabina de flujo laminar utilizando el método de la gota y dispersión por estrías [14]. Seguidamente, las placas fueron incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 10 días. Los nódulos recogidos en campo de *Desmodium* sp. fueron desinfectados y procesados de la misma manera que fue descrita anteriormente.

Todos los aislamientos bacterianos fueron transferidos a otras cajas de Petri con medio LMR con el propósito de obtener colonias con morfología persistente. Se realizó una evaluación diaria del crecimiento bacteriano de cada placa y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se determinó la morfología colonial, observándose el diámetro y color de la colonia, tipo de borde, opacidad, consistencia y tiempo de crecimiento [15]. Además, se evaluó el cambio de pH en el medio de cultivo de levadura manitol con adición de azul de bromotimol (LMA+AB). Los aislamientos puros se mantuvieron en tubos de ensayo de medio LMA en refrigeración a 4°C .

Evaluación de la capacidad simbiótica *in vitro* de los aislamientos obtenidos

Los aislamientos obtenidos a partir de nódulos generados por la adición de la suspensión de las muestras de suelos en plantas de leucaena y los aislamientos obtenidos a partir de nódulos de *Desmodium* sp. recolectados en campo, además de tres cepas de rizobios Vp16, Lc348, Din3 del banco de cepas de rizobios del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la UFRGS, fueron evaluados en cuanto a su capacidad para inducir la formación de nódulos en plantas de leucaena en condiciones *in vitro*. Para esto, se usaron tubos de ensayo que contenían 30 mL de solución nutritiva de Sarruge [13] al 25% semisólida, previamente esterilizado en autoclave.

Los aislamientos obtenidos fueron transferidos para obtener los inóculos en tubos falcon que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido de levadura manitol (LM) y se mantuvieron en una incubadora orbital a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación a 120 rpm según el tiempo de crecimiento de cada aislamiento, hasta alcanzar una concentración de 10^8 células.mL⁻¹ verificada por medio de recuento en placa.

En cabina de flujo, en cada tubo fue colocada una semilla de leucaena pre-germinada en cabina de flujo laminar, realizándose 3 repeticiones por cada aislamiento bacteriano. Luego, se inoculó 1 mL del caldo de cada aislamiento en cada tubo. Después de la inoculación, los tubos se mantuvieron en un lampadario con 8 h luz por día a temperatura ambiente de 30°C aproximadamente. Se utilizó como control un tubo no inoculado. Transcurrido un período de 40 días, fue observada la formación de nódulos en las raíces de las plantas y verificado si estos se encontraban activos por la coloración rojiza que genera la actividad de la leg-hemoglobina, que indica la fijación biológica de N.

Evaluación de la eficiencia simbiótica en la fijación de nitrógeno por los rizobios

Los aislamientos de rizobios fueron seleccionados del experimento *in vitro* anteriormente descrito, por su capacidad de inducir la formación de nódulos en plantas de leucaena. Estos aislamientos, fueron evaluados en cuanto a su eficiencia en la fijación biológica de N en condiciones de invernadero. Para esto, cinco semillas de leucaena previamente escarificadas y desinfectadas fueron sembradas en vasos Leonard, que contenían una mezcla de vermiculita y arena (2:1) en la superior y en la parte inferior solución nutritiva Sarrugue [13] exenta de N. Seguidamente, se realizó la inoculación de las semillas con los aislamientos de rizobios seleccionados, adicionando 2 mL de inóculo en concentración de 10^{-8} células.mL⁻¹. Se utilizaron como tratamiento control las cepas de la colección SEMIA: 6361 (*Bradyrhizobium* sp), 6097 (*Bradyrhizobium* sp), 4077 (*Rhizobium tropici* CIAT 899) recomendadas para leucaena y liberadas por el Ministerio Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA) de Brasil para la industria de inoculantes. Una semana después, se hizo el raleo de las plantas dejando solo una planta por vaso.

Se siguió un diseño experimental de bloques al azar con 17 tratamientos y cinco repeticiones, donde fueron evaluados 11 aislamientos, 2 cepas recomendadas de la colección de cepas "SEMIA" de rizobios y dos controles sin inoculación. Uno de estos controles sin inocular fue sin adición de N (Control-N) y el otro con adición de N (Control+N), utilizándose una dosis de N de 100 kg.ha⁻¹ en la forma de nitrato de amonio (NH₄NO₃). Esta dosis de N se adicionó fraccionada, semanalmente en 6 aplicaciones de 10 mL de una solución (1,2 g.L⁻¹) de NH₄NO₃.

Transcurrido un periodo de 60 días de cultivo, las plantas fueron retiradas de los vasos, separando la parte aérea del sistema radicular. Se determinó la masa seca de la parte aérea (MSPA), la masa seca de la raíz (MSR), el número de nódulos (NN) y el nitrógeno total acumulado (Nac) de la parte aérea y posteriormente el índice de eficiencia relativa (IER) [16] de la fijación biológica de N de los aislamientos de rizobios. Para esto, la parte aérea de las plantas se colocó en bolsas de papel y se dejó secando en un horno de circulación forzada a 65°C durante tres días, luego se procedió a molerlas para la posterior determinación de N [17]. Las raíces fueron lavadas con el fin de eliminar las partículas del sustrato adheridas, los nódulos se separaron para su cuantificación y las raíces se secaron en el horno y se pesaron en la balanza.

El IER se calculó utilizando la fórmula (Ec.1) [16]:

$$EFR = ((NT - NT - N) / (NT + N - NT - N)) \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

NT = nitrógeno total de la planta con tratamiento inoculado.

NT-N = nitrógeno total del tratamiento control no inoculado y sin adición de nitrógeno, que en este caso fue considerado como 0 mg debido a que la masa seca de este tratamiento fue poca, lo que no permitió su análisis. Sin embargo, las plantas tienen una baja cantidad de nitrógeno que proviene de la reserva de la semilla [18].

NT+N = nitrógeno total del tratamiento control no inoculado con adición de nitrógeno.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$), utilizando el paquete estadístico SPSS 15.

RESULTADOS

Aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo

En el aislamiento a partir de muestras de suelo utilizando plantas de leucaena como trampa para obtener nódulos, se obtuvieron 17 aislamientos, distribuidos así: 2 a partir de la muestra 1 (Leu09, Leu10), 2 de la muestra 2 (Leu11, Leu12), 1 de la muestra 3 (Leu13), 8 de la muestra de 4 (Leu01, Leu02, Leu03, Leu04, Leu05, Leu06, Leu07, Leu08), 1 a partir de la muestra 5 (Leu14), 1 de la muestra 6 (Leu15) y 2 de la muestra 7 (Leu16, Leu17) (Cuadro 2). Resultados similares fueron encontrados en un estudio de caracterización de rizobios simbiotes de leucaena en diferentes locales en Mérida (México), donde se obtuvieron 23 aislamientos de rizobios [15].

Se observó una escasa nodulación a partir de las muestras de suelo de algunos puntos de muestreo y esto puede deberse a que no existían cultivos o plantas de leucaena en estas localidades, con excepción de la muestra 4 donde se obtuvo el mayor número de aislamientos con 47 % (Figura 1) que fue tomada de suelo rizósferico de una planta de leucaena. Las plantas de leucaena se caracterizan por presentar una alta especificidad para establecer asociación simbiótica con rizobios, lo que limita la fijación biológica de N con los rizobios que forman nódulos [11,20]. En un estudio de aislamientos de rizobios en diferentes puntos de muestreo en campo, fueron encontrados también una baja nodulación, atribuyendo esto a la inexistencia de cultivos de leucaena [20].

A partir de los nódulos de plantas de *Desmodium* sp recolectadas en el campo se obtuvieron 12 aislamientos, que posteriormente fue determinado si tenían la capacidad de formar nódulos en las plantas de leucaena (Cuadro 2).

Evaluación de la capacidad simbiótica *in vitro* de los aislamientos obtenidos

En la prueba de evaluación de la capacidad simbiótica *in vitro* de los aislamientos obtenidos, fue evidenciada por la producción de la coloración rojiza al interior del nódulo por actividad de la leg-hemoglobina, siendo determinados como rizobios simbiotes de leucaena los aislamientos Leu01, Leu02, Des04, Des05, Des06, Des09, Des15 y Des23 (Cuadro 2), los cuales fueron seleccionados para el experimento de eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno. Las tres cepas Vp16, Lc348, Din3 del banco de aislamientos de rizobios del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la UFRGS, que fueron incluidas en este experimento no tuvieron la capacidad para inducir la formación de nódulos, a pesar de su capacidad de establecer simbiosis con otras leguminosas [12].

La evaluación de simbiosis de los aislamientos con leucaena fue determinada por la actividad de la leghemoglobina evidenciada nos nódulos siendo considerados fix (+) activos, fix (-) negativo. Des: *Desmodium* sp.; Leu: *Leucaena leucocephala*; LMA+AB: Levedura manitol agar+ azul de bromotimol

Evaluación de la eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno de los rizobios

Los resultados de MSPA, MSR, NN, Nac y el índice IER determinados en las plantas de leucaena inoculadas con los aislamientos y las cepas SEMIA de rizobios son presentados en el Cuadro 3.

Se encontró una mayor masa seca en los tratamientos con los aislamientos de rizobios Leu01, Leu02, las tres cepas SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077, presentando diferencias con el tratamiento control no inoculado y sin adición de N (Control-N), como tampoco hubo diferencias con el tratamiento control no inoculado, que recibió adición de nitrógeno (Control+N) según la prueba de Tukey. Estos resultados indican que tanto los aislamientos de rizobios Leu01 y Leu02 como las cepas SEMIA promueven el crecimiento de las plantas de leucaena. Resultados similares fueron obtenidos en un estudio con cepas nativas de *Rhizobium* sp inoculadas en plantas de

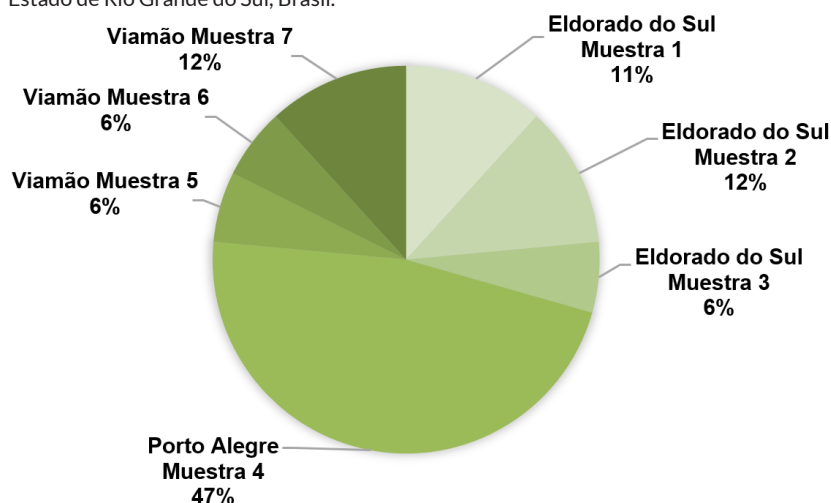
Cuadro 2. Origen, características fenotípicas, tiempo de crecimiento en medio LMV, prueba de reacción ácido o alcalina en medio LMA+AB, verificación de nódulos activos de los aislamientos obtenidos de suelos de Río Grande do Sul y de nódulos de plantas de *Desmodium* sp, evaluados como simbioses de leucaena.

Aislamiento	Lugar/ Muestra	Forma	Borde	Elevación	Color	Opacidad	Consistencia	Tiempo de crecimiento (días)	Tamaño (mm)	Nódulos activos Leucaena Fix*	Reacción ácido/ alcalina LMA+AB
Des01	Eldorado do Sul / 1	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Opaca	Gomosa	4	5	-	Acida
Des04					Blanca	Opaca	Gomosa	4	7	+	Acida
Des05					Branca	Opaca	Gomosa	3	7	+	Acida
Des06					Blanca	Brillante	Gomosa	4	5	+	Acida
Des08					Blanca	Opaca	Gomosa	3	6	-	Acida
Des09					Blanca	Opaca	Gomosa	4	5	+	Alcalina
Des14					Blanca	Opaca	Gomosa	4	5	-	Acida
Des15					Blanca	Opaca	Gomosa	3	4	+	Acida
Des21					Blanca	Opaca	Gomosa	3	4	-	Acida
Des22	Eldorado do Sul / 3	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Opaca	Gomosa	4	4	-	Acida
Des23					Rosada	Opaca	Gomosa	4	5	+	Acida
Des26					Rosada	Brillante	Gomosa	4	9	-	Acida
Leu01					Blanca	Opaca	Gomosa	3	4	+	Acida
Leu02	Porto Alegre / 4	Puntiforme	Entero	Convexa	Blanca	Opaca	Gomosa	3	3	+	Acida
Leu03					Blanca	Brillante	Gomosa	3	2	-	Acida
Leu04					Rosada	Opaca	Acuosa	5	1	-	Alcalina
Leu05		Rosada			Brillante	Acuosa	3	3	-	Alcalina	
Leu06		Blanca			Brillante	Gomosa	3	2	-	Acida	
Leu07		Blanca			Opaca	Acuosa	3	3	-	Alcalina	
Leu08		Blanca			Brillante	Gomosa	4	1	-	Alcalina	
Leu09		Rosada			Opaca	Gomosa	4	1	-	Alcalina	
Leu10		Rosada			Opaca	Gomosa	5	1	-	Alcalina	
Leu11	Eldorado do Sul / 2	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Opaca	Acuosa	5	≤ 1	-	Alcalina
Leu12					Rosada	Brillante	Gomosa	5	1,5	-	Alcalina
Leu13					Rosada	Opaco	Gomosa	5	≤ 1	-	Alcalina
Leu14	Viamão/ 5	Puntiforme			Rosada	Opaca	Acuosa	5	≤ 1	-	Alcalina
Leu15					Rosada	Opaco	Acuosa	5	1	-	Alcalina
Leu16					Rosada	Opaco	Acuosa	5	≤ 1 mm	-	Alcalina
Leu17	Viamão/ 7	Circular			Rosada	Brillante	Gomosa	5	5	-	Alcalina

leucaena, donde las cepas contribuyeron en el aumento la masa seca de las plantas [11]. En contraste, difieren de los resultados encontrados en un estudio realizado con cepas de la colección de rizobios del Instituto Nacional de Investigaciones de la Amazonia (INPA) de Brasil, que fueron inoculadas en plantulas de leucaena, evaluando el efecto sobre la masa seca y comparadas con el control sin inocular y que recibió fertilización nitrogenada, no encontrando diferencias entre los tratamientos [21].

Por otra parte, fue evidenciado en las plantas de leucaena inoculadas con los aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de *Desmodium* sp. una baja MSPA, semejante al tratamiento control no inoculado sin adición de N (Control-N). Estos resultados pueden estar asociado a la baja nodulación presentada, a pesar de que estos aislamientos de rizobios fueron determinados como simbios de leucaena en la prueba de capacidad simbiótica,

Figura 1. Porcentaje de aislamientos obtenidos de muestras de suelo por localidades del Estado de Rio Grande do Sul, Brasil.



Cuadro 3. Valores promedio de masa seca de la parte aérea (MSPA), masa seca de la raíz (MSR), número de nódulos (NN), nitrógeno acumulado (Nac) de las plantas inoculadas con rizobios y el índice de eficiencia relativa (IER).

Tratamientos	MSPA	MSR	NN	Nac	IER
	g		-	mg	%
Control+N	0,35 a	0,24 a	0 d	6,32 a	100
SEMIA 6361	0,41 a	0,24 a	30 b	10,78 a	141
SEMIA 6097	0,33 a	0,24 a	32 b	7,69 a	113
SEMIA 4077	0,43 a	0,20 a	35 ab	10,83 a	148
Leu01	0,37 a	0,21 a	40 a	9,31 a	129
Leu02	0,37 a	0,21 a	34 b	8,00 a	127
Des04	0,14 b	0,09 a	6 c	0,00*	0
Des05	0,14 b	0,11 a	8 c	0,00*	0
Des06	0,16 b	0,11 a	8 c	0,00*	0
Des09	0,12 b	0,13 a	9 c	0,00*	0
Des15	0,15 b	0,10 a	9 c	0,00*	0
Des23	0,16 b	0,12 a	9 c	0,00*	0
Control-N	0,10 b	0,09 a	0 d	0,00*	0

* No determinado en este tratamiento por la poca cantidad de muestra. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, según prueba de tukey al 5%.

concordando con un trabajo similar [20], donde fue reportado que no todos los rizobios que establecen simbiosis con leguminosas son eficientes en la fijación biológica de N.

En la variable masa seca de la raíz, no fueron observadas diferencias entre los tratamientos, lo que indica que los rizobios no estimularon el crecimiento radicular de plantas de leucaena.

En relación al número de nódulos (NN) se evidenció que los aislamientos de rizobios Leu01, Leu02 y las tres cepas (SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077) fueron los que tuvieron mayor capacidad de formar nódulos en comparación con los aislamientos de nódulos de *Desmodium* sp. simbiotes de leucaena que presentaron una baja nodulación. Estos resultados coinciden con los observados en un estudio de establecimiento de sistemas silvopastoriles en campo, donde semillas de leucaena fueron inoculadas con el producto comercial Ferbiol que contenía la cepa *Rhizobium loti*, cultivadas en vivero y posteriormente sembradas en campo, durante ocho semanas, donde no evidenciaron diferencias en el número de nódulos entre las plantas inoculadas y no inoculadas, sin embargo encontraron que los nódulos de las plantas no inoculadas se encontraban inactivos, ya que son nódulos establecidos por rizobios autóctonos del suelo [3]. Otros resultados similares fueron evidenciados en una investigación realizada en invernadero con aislamientos *Rhizobium* sp. nativos y una cepa comercial inoculados en semillas y plántulas de leucaena, que estimularon la nodulación de las plantas favoreciendo la fijación de N [11].

En el N acumulado por las plantas, los resultados obtenidos muestran que los aislamientos de rizobios Leu01, Leu02 y las tres cepas (SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077) proporcionaron una acumulación de N similar al tratamiento control no inoculado que recibió fertilización nitrogenada (Control+N) según la prueba de Tukey, con la diferencia de que nitrógeno acumulado por las plantas inoculadas con rizobios es proveniente de la fijación biológica de N y de la reserva que poseen las semillas [18]. Resultados similares fueron encontrados en un estudio, donde los aislamientos de *Rhizobium* sp. y las cepas comerciales incrementaron el porcentaje de nitrógeno en las plantas de leucaena inoculadas favoreciendo el crecimiento vegetal en condiciones de invernadero [11].

Por otra parte, el índice de eficiencia relativa (IER) (BROCKWELL *et al.*, 1966) que muestra el porcentaje de eficiencia de una bacteria en asociación simbiótica con leguminosas en fijar N, permitió evidenciar que tanto los aislamientos Leu01 y Leu02 como las tres cepas (SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077) presentaron porcentaje de eficiencia similar o superior al control no inoculado, que recibió fertilización nitrogenada (Control+N), lo que permite inferir que estos aislamientos y cepas son eficientes en la fijación biológica de N.

CONCLUSIONES

Los aislamientos de rizobios Leu01 y Leu02 obtenidos en este estudio son eficientes en fijar nitrógeno en asociación simbiótica con plantas de leucaena. Por tanto, podrían ser utilizados en próximas etapas de estudios de invernadero y campo, para su evaluación agronómica que comprueben su potencial como futuras cepas de inoculantes.

Los aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de *Desmodium* sp. no son eficientes en la fijación biológica de nitrógeno en plantas de leucaena.

REFERENCIAS

- [1] JETANA, THONGSUK. Potential Benefits from the Utilization of *Leucaena leucocephala* in Thai Swamp Buffaloes Production. Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology, 2017, p. 90-103.
10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.90-103

- [2] NICODEMO, M.; GARCIA, A.; PORFIRIO-DA SILVA, V.; PACIULLO, D. Desempenho, saúde e conforto animal em sistemas silvipastoris no Brasil. Brasília D.F. (Brasil): Embrapa Pecuária Sudeste-Documents (INFOTEC-E), 2018.
- [3] BUENO-LÓPEZ, LILIANA; CAMARGO- GARCIA, JUAN-CARLOS. Nitrógeno edáfico y nodulación de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles. Acta Agronómica, v. 64, n. 4, 2015, p. 349-354. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n4.45362>
- [4] ESCALANTE, EDUARDO. Use and performance of leucaena (*Leucaena leucocephala*) in Venezuelan animal production systems. Tropical Grasslands-Forrajeros Tropicales, v. 7, n. 4, 2019, p. 407-409. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)407-409](https://doi.org/10.17138/tgft(7)407-409)
- [5] KANT, RAVI; BISHIT, ROHIT; KUMAR, MANOL. Effect of Supplementation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Leucaena) Leaves on Growth Profile of Crossbred Calves. International Journal of Livestock Research, v. 9, n. 5, 2019, p. 154-159. 10.5455/ijlr.20181212024424
- [6] MATTOS-RIBEIRO, VANDJORE; VALMORBIDA, RAQUEL; DALPIVA-HARTMANN, KATIA-CRISTINA; PORTO, ERLY-CARLOS; ALMEIDA, JULIANA; MALAGUTTI-CORSATO, JAQUELINE; TEIXEIRA-FORTES, ANDRÉA-MARIA. Efeito alelopático de *Leucaena leucocephala* e *Hovenia dulcis* sobre germinação de *Mimosa bimucronata* e *Peltophorum dubium*. Iheringia. Série Botânica, v. 74, 2019, p. 1-7. <https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019006>
- [7] CONRAD, KATHRYN; DALAL, RAM; DALZELL, SCOTT; ALLEN, DIANE; FUJINUMA, RYOSUKE; MENZIES, NEAL. Soil nitrogen status and turnover in subtropical leucaena-grass pastures as quantified by $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance. Geoderma, v. 313, 2018, p.126-134. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.029>
- [8] KAMINSKI, P.E.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; PAIM, N.R. Growth and survival of a range of *Leucaena* species in southern Brazil. Tropical Grassland, v. 39, 2005, p. 1-8.
- [9] RAMÍREZ-BAHENA, MARTHA-HELENA; FLORES-FÉLIX, JOSÉ-DAVID; VELÁZQUEZ, ENCARNACIÓN; PEIX, ÁLVARO. The Mimosoid tree *Leucaena leucocephala* can be nodulated by the symbiovar genistearum of *Bradyrhizobium canariense*. Systematic and Applied Microbiology, v. 43, n. 1, 2020, p. 126041. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126041>
- [10] KANG, XIA; YU, XIUMEI; ZHANG, YU; CUI, YONGLIANG; TU, WEIGUO; WANG, QIONGYAO; LI, YANMEI; HU, LANFANG; GU, YUNFU; ZHAO, KE; XIANG, QUANJU; CHEN, QIANG; MA, MENGGEN; ZOU, LIKOU; ZHANG, XIAOPING; KANG, JINSAN. Inoculation of *Sinorhizobium saheli* YH1 Leads to Reduced Metal Uptake for *Leucaena leucocephala* Grown in Mine Tailings and Metal-Polluted Soils. Frontiers in Microbiology, v. 9, 2018, p. 1-13. 10.3389/fmicb.2018.01853
- [11] CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO; MILIAN-MINDIOLA, PABLO-ERNESTO; HERNÁNDEZ-MULFORD, JORGE-LUIS; PERALTA-CASTILLA, ARNALDO. Biological fixation of nitrogen by native isolates of *Rhizobium* sp. symbionts of *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. Acta Agronómica, v. 68, n. 2, 2019, p. 75-83. 10.15446/acag.v68n2.69322
- [12] LEMES-DOS SANTOS, FRANCIANE. Inoculação e coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de arroz, milho e trigo [Ph.D Thesis Ciência do Solo]. Porto Alegre (Brasil): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, 2018, 106 p.
- [13] SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. Summa Phitopathologica, Botucatu, v. 1, n. 3, 1975, p. 231-233.
- [14] GOULART-MACHADO, RAFAEL; SACCOL-DE SÁ, ENILSON-LUIZ; OLDRA, SUÉLEN; DALLA-COSTA, MURILO; DALLAGNOL, GILBERTO; DA SILVA-SANTOS, NEEMIAS; ROSA-DA SILVA, WILLIAM. Rhizobia isolation and selection for serradella (*Ornithopus micranthus*) in Southern Brazil. African Journal of Microbiology Research, v. 10, 2016, p. 1894-1907. 10.5897/AJMR2016.8327
- [15] TZEC-GAMBOA, MAGNOLIA; SOLORIO-SÁNCHEZ, FRANCISCO; FIEBRIG, IMMO; TORRES-CALZADA, CLAUDIA; PEÑA-CABRIALES, JUAN J.; ORTIZ-VAZGUEZ, ELIZABETH. Biochemical and Molecular Characterization of Native Rhizobia Nodulating *Leucaena leucocephala* with Potential Use as Bioinoculants in Yucatan, Mexico. Chiang Mai Journal of Science, v. 47, n. 1, 2020, p.1-15.

- [16] BROCKWELL, J.; HELY, F.W.; NEAL-SMITH, C.A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, v. 6, 1966, p. 365–370.
<https://doi.org/10.1071/EA9660365>
- [17] MENEGHETTI, A.M. Manual de Procedimientos de amostragem e análise química de plantas, solo e fertilizantes. Curitiba (Brasil): Editora da Universidade Tecnológica Federal de Paraná, 2018, 251 p.
- [18] EL KADER, ABED; MOLINA, E.A.; MONTERO, K.C.; GUTIERREZ, O.; TRONCONE, G.; LEÓN-DE PINTO, G.. Datos analíticos de la goma de la semilla de *Leucaena leucocephala*. Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia, v. 25, n. 1, 2008, p. 95-118.
- [19] RINCÓN, J.; CLAVERO T.; RAZZ, R.; PIETROSEMOLI, S., MENDEZ F.; NOGUERA, N. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en *Leucaena* (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, v. 17, n. 4, 2000, p. 342-357.
- [20] HERNÁNDEZ-MULFORD, JORGE-LUIS; CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN GUILLERMO; MILIAN, PABLO-ERNESTO. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* sp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical, v. 2, 2012, p. 51–62.
- [21] PINTO-RAMOS, DANIELLE-BRAULE; GOMEZ-DE SOUZA, LUIZ-AUGUSTO. Seleção de estirpes de rizóbios para formação de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) em Argissolo Vermelho Amarelo. Revista Brasileira de Agroecologia, v. 8, n. 1, 2013, p. 28-39.

Development of expanded matrix elaborated from starch and cassava flour by extrusion*

Desarrollo de una matriz expandida elaborada a partir de almidón y harina de yuca por extrusión

Desenvolvimento de uma matriz expandida feita por farinha e amido de mandioca por extrusão

LUCIO-IDROBO, YERALDIN¹; ARBOLEDA-MUÑOZ, GERMAN-ANTONIO²;
DELGADO-MUÑOZ, KAREN-LORENA³; VILLADA-CASTILLO, HÉCTOR-SAMUEL⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 25 de Agosto 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Title of origin project: "Research and development of biodegradable packages". Financing: General Royalties System (SGR by its Spanish acronym). Ending: 30 november 2020.

- 1 Universidad del Cauca, Research Group Science and Technology of Biomolecules of Agroindustrial Interest, CYTBIA. Agroindustrial Engineer. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1283-3125>
- 2 Universidad del Cauca, Research Group Science and Technology of Biomolecules of Agroindustrial Interest, CYTBIA. Master in Organization and Project Management. Popayán, Colombia. <http://orcid.org/0000-0003-2900-880X>
- 3 Universidad del Cauca, Research Group Science and Technology of Biomolecules of Agroindustrial Interest, CYTBIA. Specialist in Technological Innovation Management. Student of Doctorate in Engineering in Universidad del Valle. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5251-5984>
- 4 Universidad del Cauca, Agroindustry Department, ViceChancellor of Research, Research Group Science and Technology of Biomolecules of Agroindustrial Interest, CYTBIA. PhD in Engineering. Popayán, Colombia. <http://orcid.org/0000-0002-5557-3215>

Correspondence: garboleda@unicauca.edu.co

ABSTRACT

In the search for alternatives to materials such as expanded polystyrene, interest in the development of packaging derived from starch has grown, which represent challenges from a technological point of view due to the weaknesses they may present. Against this, the inclusion of raw materials such as flours can contribute to increasing its properties. Due to this, the aim of this study was to obtain an expanded material from starch and cassava flour by single screw extrusion. Two experimental designs were made: the first included two factors, cassava flour content and moisture percentage and the second design used two factors, temperature profile and screw speed. According to the main results, the combinations that presented outstanding mechanical properties were mixing with 15% flour and 22% moisture, under process conditions of 100 rpm and 125°C. From this, it was concluded that it was possible to obtain an expanded matrix from a mixture of starch and cassava flour with characteristics of high density, low expansion index and low compressive strength.

RESUMEN

En marco de la búsqueda de alternativas a materiales como el poliestireno expandido, ha crecido el interés por el desarrollo de empaques derivados de almidón, los cuales representan retos desde el punto de vista tecnológico por las debilidades que pueden presentar. Frente a esto, la inclusión de materias primas como harinas puede contribuir a incrementar sus propiedades. Debido a esto, se planteó como objetivo la obtención de un material expandido a partir de almidón y harina de yuca por extrusión de tornillo simple. Para esto, se realizaron dos diseños experimentales: el primero incluyó dos factores, el contenido de harina de yuca y el porcentaje de humedad y el segundo diseño utilizó dos factores, el perfil de temperatura y la velocidad del tornillo. De acuerdo con los principales resultados, las combinaciones que presentaron propiedades mecánicas sobresalientes fueron la mezcla con 15% de harina y 22% de humedad, en condiciones de proceso de 100 rpm y 125°C. A partir de esto, se concluyó que fue posible obtener una matriz expandida a partir de mezcla de almidón y harina de yuca con características de alta densidad, bajo índice de expansión y baja resistencia a la compresión.

RESUMO

Na busca de alternativas a materiais como o poliestireno expandido, aumentou o interesse no desenvolvimento de embalagens derivadas de amido, o que representa desafios do ponto de vista tecnológico devido às fragilidades que podem apresentar. Contra isso, a inclusão de matérias-primas como farinhas pode con-

KEYWORDS:

Biodegradable; Packaging; Foam; Starch; Flour; Matrix;

PALABRAS CLAVE:

Biodegradable; Empaque; Espuma, Almidón; Harina; matriz.

PALAVRAS-CHAVE:

Biodegradável; Embalagem; Espuma; Amido; Farinha; Matriz.

Cómo citar este artículo: LUCIO-IDROBO, YERALDIN; ARBOLEDA-MUÑOZ, GERMAN-ANTONIO; DELGADO-MUÑOZ, KAREN-LORENA; VILLADA-CASTILLO, HÉCTOR-SAMUEL. Development of expanded matrix elaborated from starch and cassava flour by extrusion. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 139-152. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)139-152](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)139-152)

tribuir para o aumento de suas propriedades. Devido a isso, o objetivo era obter um material expandido a partir de amido e farinha de mandioca por extrusão com um único parafuso. Foram realizados dois delineamentos experimentais: o primeiro, com dois fatores, o teor de farinha de mandioca e a porcentagem de umidade, eo segundo, dois fatores, perfil de temperatura e velocidade do parafuso. De acordo com os principais resultados, as combinações que apresentaram excelentes propriedades mecânicas foram misturadas com 15% de farinha e 22% de umidade, sob condições de processo de 100 rpm e 125°C. A partir disso, concluiu-se que era possível obter uma matriz expandida a partir de uma mistura de amido e farinha de mandioca com características de alta densidade, baixo índice de expansão e baixa resistência à compressão.

INTRODUCTION

In recent years, development of foamed materials has focused on the production of green polymer foams from renewable raw materials [1]. The development of starch-based foams is emerging as an important substitute for traditional foams derived from petroleum [2], in particular application as loss fill, because starch is non-toxic, inexpensive, abundant, biodegradable, versatile and a renewable agricultural resource [3].

However, these are generally fragile with low mechanical properties and high hydrophilicity [4]. Thus, cassava flour consists mainly of starch (76,4%), moisture (11,9%), protein (2,8%), fiber (2,0%), ash (2,0%) and fat (0,6%) and sticking temperature around 74°C [5, 6]. Cassava flour has 72,61% to 87,71% amylopectin and 12,28% to 27,38% amylose [7]. Elements like fraction of lignocellulosic fibers, protein, and lipids, can improve starch-based foams properties [4] and this can help to bioplastic industry because they present advantages compared to the synthetic packaging like use of renewable sources, potential and edibility biodegradability [7].

Others elements can be added to the formulation to improve starch foam properties, like biopolymers and natural fibers [8]. Different studies have used starch by production of foam using other components like polylactic acid (PLA) [9], sugarcane bagasse [10] or polyvinyl alcohol [11]. The aim of this research was to obtain an expanded matrix using starch and cassava flour mixtures using a single-screw extrusion process.

METHOD

Materials

Cassava starch (*Manihot esculenta* Crantz) variety *Verónica* (Almidones de Sucre, Córdoba-Colombia), refined cassava flour (Clayuca S.A.S, Cali-Colombia) and distilled water (Biotechnology Laboratory, Universidad del Cauca, Popayan - Cauca) were used. Glycerol was used as an additive (99,5% purity, Disan S.A, Cali- Colombia).

Extrusion conditions

Mixes of cassava flour, starch, water and glycerol were prepared and mixed. Using a compositional water balance was adjusted to the required moisture and mixed for 10 minutes, until a homogeneous mixture was achieved. Glycerol content (2%) was constant by every sample. The mixtures were stored in an airtight container and left to stand for 48 hours. After they were processed in a ThermoScientific single screw extruder, model Haake PolyLab OS, Germany, provided with a 19 mm diameter barrel, a screw with a 5:1 compression ratio and L/D ratio of 25 with a die of 3 mm diameter nozzle.

Experimental design

Two consecutive experimental designs were made.

Experimental design 1. Determination of the mixture composition. An experimental factorial design 3^2 was carried out, with three replicates per treatment, where two factors were evaluated (flour content and moisture in the mixture) with three levels each one. Table 1 shows first experimental design. The treatments were obtained using a temperature profile of 125°C with a screw speed of 100 rpm. The conditions were determined based on preliminary essays.

Experimental design 2. Determination of extrusion conditions in the mixture. In this factorial experimental design 3^2 the factors were evaluated: temperature profile (°C) and screw rotation speed (rpm), both with three levels, with three replicas per treatment. The mixture to be processed was the one chosen in the experimental design for the mixing conditions. Table 2 shows second experimental design.

The tests were carried out in the Laboratory of Rheology and Packaging of the Universidad del Cauca, in Popayán, Cauca, Colombia (1760 m MSL, 19°C average temperature and 77% average humidity).

The obtained materials were conditioned to a constant relative humidity of $50 \pm 1\%$ and temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for a period of 8 days in a climatic chamber according ASTM D618-13 [12].

Determination of physical properties

Apparent density. It was defined according to the parameters established in ASTM D3748 [13], which sets forth the standard practice for the evaluation of high density rigid cellular plastics, in addition to making reference to test me-

Table 1. Experimental design for the mixture composition.

Treatment	Composition		Response Variables
	Cassava flour (%)	Humidity of the mixture (%)	
TM1	15	18	1
TM2		20	
TM3		22	
TM4	30	18	
TM5		20	
TM6		22	
TM7	45	18	
TM8		20	
TM9		22	

¹Compressive strength (MPa), Modulus of elasticity (MPa); Apparent density (kg/m^3); Radial Expansion Ratio

Table 2. Experimental design for process conditions.

Treatment	Process conditions		Response variables
	Screw rotation speed (rpm)	Average temperature profile (°C)	
TP1	100	125,00	1
TP2	120		
TP3	140		
TP4	100	127,25	
TP5	120		
TP6	140		
TP7	100	129,50	
TP8	120		
TP9	140		

¹Compressive strength (MPa), Modulus of elasticity (MPa); Apparent density (kg/m^3); Radial Expansion Ratio

thods such as ASTM 1622 [14]. The diameter of the extruded materials was measured along a 10 cm long section. Averages of ten diameter measurements were used. A circular cross-sectional area of the extruded part, calculated from the average diameter, was assumed. All measurements were made in triplicate. The volume was determined by taking its dimensions (diameter and height) with a caliper foot and then each of the specimens was weighed in an analytical balance to finally calculate the density through the relationship between weight and volume.

Radial expansion index. It was determined using the relationship between the cross-sectional area of the expanded extrudate and the cross-sectional area of the die socket [15]. The diameter of the extruded materials was measured along a 10 cm long section with the aid of a caliper foot. Averages of ten diameter measurements were used. A circular cross-section area of the extruded part, calculated from the average diameter, was assumed, for which three replicates per treatment were made.

Mechanical properties of compression. The guidelines contemplated in ASTM D3748 [13], which sets forth the standard practice for the evaluation of high density rigid cellular plastics, were followed, in addition to making reference to test methods such as ASTM D-695 [16], which establishes the procedure for executing the compression test on rigid plastic materials, where it is described that the test sample must have dimensions such that the ratio of slenderness (Length/Radius) is of an interval of 11 to 16:1. Compressive strength and modulus of elasticity were measured on a universal machine under the following operating conditions: 500 N cell, 1,3 mm/min head speed and 500 points/s data collection speed.

All statistical comparison tests were performed with the SPSS statistical package (SPSS, Inc., Version 21). The results obtained in each experimental design were subjected to a normality test using the Shapiro-Wilk test. Followed by a variance analysis (Anova) to evaluate the influence of the factors studied on the properties of the expanded one, followed by the Levene test and finally the test of multiple comparisons according to the homogeneity of their variances (T3 of Dunnett or Tukey) to establish the differences between the treatments contemplated in the experimental designs All the analyses were performed with a significance level of 0,05.

RESULTS

Experimental design I

All data were found to conform to a normal distribution, based on the results of the Shapiro-Wilk test. According to the variance analysis test (Anova) there was an important effect on all the response variables, with the exception of the flour content on the expansion index. The effect of the inclusion of the flour on the apparent density and of the humidity on the compressive strength was evident.

The interaction between the factors generated a significant effect on the totality of the response variables, indicating that the factors did not produce their effect independently, but on the contrary the effect produced was linked to a joint action of both the flour and water content. When this situation occurred, it became necessary to carry out the analysis by treatments, given that these are the expression of the interaction between the two factors. Subsequently, it was verified by means of the Levene test that the response variables fulfilled the assumption of homogeneity of variances, with the exception of the modulus of elasticity. It was therefore necessary to carry out a multiple comparison test by Tukey and T3 by Dunnett, according to the homogeneity of the variances.

Dunnett's T3 test for the modulus of elasticity yielded five subgroups, resulting in different TM7 and TM3 treatments, with values of 102,44 MPa and 305,41 MPa respectively. As it was shown in the Anova, the flour content was the factor that caused the greatest effect on this response variable, as it presented a higher F statistic. Table 3 shows Anova results.

Table 3. Variance analysis for mixture composition.

Factor	Dependent variable	F	Sig.
Cassava flour	1	12,891	,000
	2	33,016	,000
	3	72,575	,000
	4	3,421	,055
Humidity of the mixture	1	172,457	,000
	2	16,158	,000
	3	102,866	,000
	4	42,267	,000
Interaction	1	26,903	,000
	2	31,010	,000
	3	12,395	,000
	4	13,329	,000

¹Compressive strength (MPa), ²Modulus of elasticity (MPa); ³Apparent density (kg/m³);

⁴Radial Expansion Ratio

Regarding the influence of the moisture content on these results, although in the TM3 treatment it contained higher humidity (22%) than the TM7 treatment (18%), where according to what was previously established, higher moisture content would mean a higher expansion rate, however this was not effectively presented for in this study.

For apparent density and radial expansion ratio Tukey's test yielded four subgroups for each response variable. Regarding apparent density, TM7 treatment had the lowest value (561,67 kg/m³) and TM3 treatment had the highest value (876,33 kg/m³). Contrary behavior was observed with the expansion index, where the TM7 treatment reported a higher index (6,89) than the TM3 treatment (4,73), thus proving an inversely proportional relationship between these response variables.

When observing the behavior of the apparent density with the interaction of the percentage of flour and humidity in the mixture, a directly proportional relationship is found between the content of humidity and the apparent density at 15% flour content and inversely proportional between the content of flour and the apparent density at 22% moisture content. That is to say that the lowest values in density were obtained by the treatments with the lowest percentage of humidity (18%) but depending on the percentage of flour. Therefore, the TM7 treatment with the highest flour content (45%) and lowest percentage of moisture (18%) was the one that presented the lowest value of apparent density with 561,67 kg/m³. As presented in Table 4.

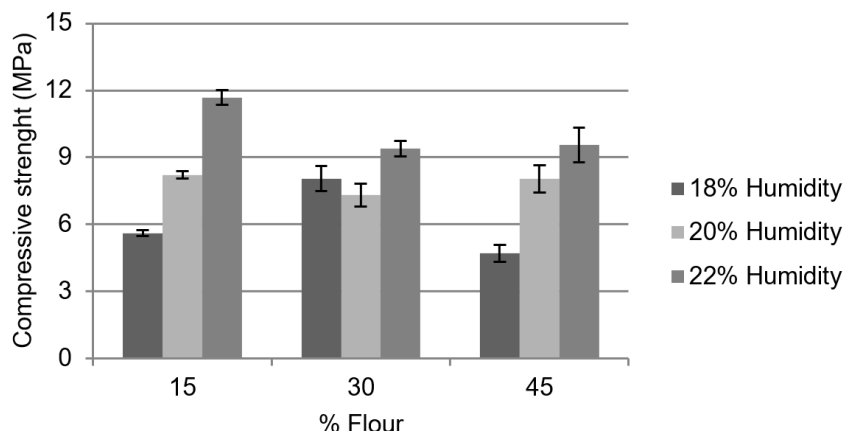
Table 4. Results of aparent density and radial expansion ratio for experimental design 1.

TM	1	Aparent density (kg/m ³)	Radial expansion ratio
TM1	15:18	687,67±0,03 ^b	6,40±0,20 ^{c,d}
TM2	15:20	825,33±0,02 ^{c,d}	5,71±0,10 ^{b,c}
TM3	15:22	876,33±0,01 ^d	4,73±0,15 ^a
TM4	30:18	718,00±0,03 ^b	5,75±0,45 ^{b,c}
TM5	30:20	725,00±0,02 ^b	6,00±0,27 ^{b,c}
TM6	30:22	792,67±0,01 ^c	5,50±0,23 ^b
TM7	45:18	561,67±0,03 ^a	6,89±0,29 ^d
TM8	45:20	726,33±0,01 ^b	5,34±0,08 ^{a,b}
TM9	45:22	729,67±0,02 ^b	5,54±0,31 ^b

¹Cassava flour:Humidity

In Figure 1, shows the compressive strength values for each of the combinations studied. The different flour concentrations at 22% moisture content showed higher values of compressive strength than at 18 and 20% moisture content. It is thus that this percentage level of humidity presented increases of 29,9% and 66,7% of compressive strength, as opposed to the percentages of 20 and 18% of humidity respectively.

Figure 1. Compressive strength behaviour according to combinations % Flour-% Humidity.



In Tukey's test for compressive strength five subgroups were obtained, presenting significant differences in treatments TM7 and TM3, with 4,70 MPa and 11,68 MPa respectively, the latter being the one that presented significant differences with respect to the other treatments, so it did not share subgroup with any other combination.

When water is mixed at high pressure and temperature it ends up being released as steam just at the nozzle outlet at atmospheric pressure [17]. Water can act as blowing agent and plasticizer, where Meng found that water content above 18% the starch-based materials foamed very well, because they had a high melting strength and rich blowing agent and the pressure of the die decreased with increasing water content of the starch pellets [18].

According to the results, the treatment with a higher modulus of elasticity coincided with the higher density values of the treatments, as well as with the higher compressive strength. In front of this, [17] they affirm that to obtain expanded of low density it is required that these are stable and do not shrink beyond the matrix, that when contracted this way a foam of high density is produced, which can be related with the obtained results, since it was identified at the moment of the processing as the contraction generated at the exit of the die nozzle was evident, which could derive in those high levels of apparent density.

This coincides with what was found for the TM7 treatment under which the lower modulus values were found, as well as the lower apparent density results and the higher expansion rates, possibly associated with the combined effect of cell diameter and cell wall thickness and high correlation between the apparent density and mechanical properties [19], causing that in expanded with a greater expansion the size of the cellular walls and its solid phase is reduced, resulting in a lower rigidity, influencing the behavior of the foam modulus that depends mainly on the cellular structure and density [20].

A higher compressive strength was possibly generated in one of the treatments that contained the maximum percentage of humidity (22%) because the starch granules could be easily disintegrated in the presence of a greater amount of water, thus allowing the formation of a continuous and strong surface [15].

Although it was found that the highest rate of radial expansion was obtained in a treatment with the maximum percentage of flour (45%), it is known that starch is the main component of flours, but it also contains other minor components such as fibers, which plays an important role in physical and mechanical properties of the extruded foams [21], where the cellulosic or lignocellulosic fibers could increase the mechanical properties for their chemical compatibility with starch [22].

This can corresponds to an action of flour as a nucleating agent, which added to a greater generation of internal pressure associated with the presence of fiber [23]. Then, it has contributed to reducing the apparent density values of the material. Although fiber can cause different effects: on the one hand, natural fibre/filler can be a good nucleating agent, but also can cause non-uniform cell size, irregular cell nucleation or a low cell density foam [24].

In addition, as mentioned above, humidity was the most influential factor on apparent density, possibly due to the fact that pressure and temperature fall drastically when the extruded material leaves the extrusion nozzle [25], which could have generated cellular spaces that when occupied by air, influenced in obtaining a higher or lower density with a higher intensity than that reflected by the flour content, where water can act as a plasticizer and blowing agent in extrusion processes, some of the water in TPS becomes steam at high temperature and acts as blowing agent, while the other part of the water bonds with starch chain and acts as plasticizer to enable starch to obtain the melting strength needed for foaming [18], where humidity content of the mixtures have an important impact on the extrusion-cooking process and on the quality of the foamed extrudates [26].

Other studies, like [27] used potato flour by obtaining of loose-fill foams, using water like blowing agent in a single screw extrusion process, where increasing the moisture contents tended to increase rigidity and irregular surfaces of foams, but, the expansion ratio and cell size of foams decreased as the moisture contents of potato flour increased.

With this first experimental design we found the mixture composition to obtain an expanded matrix by extrusion, which presented outstanding physical and mechanical properties. It was chosen that the mechanical properties of compression were the variable of decision, because these characteristics can be a significant factor in the application of the obtained material. Once analyzed the behavior of the different treatments in front of the diverse variables of response, it can be affirmed that the treatment that offered a greater compressive strength was the treatment TM3 with a value of 11,68 MPa (15% Flour and 22% Humidity), which was selected as the appropriate one for the pursuit of the obtaining of the expanded material in the following stage, in which the conditions of processing were determined.

Experimental design II

The parameters of the extrusion process, such as the temperature and speed of the screw, have a direct influence on the density, expansion ratio and other physical properties of the expanded materials [15]. Due to this, it was considered important to review under which conditions of temperature and screw speed the most favorable combination for the development of the expanded matrix of starch and cassava flour could be found.

Initially, the Shapiro-Wilk normality test was carried out, from which it was possible to prove that the data obtained from the valued response variables followed a normal distribution. Subsequently it was established with the Anova variance analysis test that in none of the screw rotation speed levels generated a significant effect on the four evaluated response variables. A similar situation occurred with the temperature profile, with the exception of the modulus of elasticity and apparent density, on which a significant effect was caused in at least one of their levels.

However, the interaction of screw speed with temperature did showed an effect on the response variables as obtained from the Anova analysis showed in Table 5. Due to this, we proceeded to analyze the treatments carrying out multiple comparisons of Tukey. Previously the Levene test was carried out where the homogeneity of variances of the samples was verified.

Table 5. Variance analysis for process conditions.

Factor	Dependent variable	F	Sig.
Screw rotation speed	1	0,887	,429
	2	0,721	,500
	3	2,206	,139
	4	0,418	,665
Temperature profile	1	2,359	,123
	2	38,139	,000
	3	11,917	,001
	4	1,982	,167
Interaction	1	5,310	,005
	2	5,567	,004
	3	3,441	,030
	4	4,614	,010

¹Compressive strength (MPa), ²Modulus of elasticity (MPa); ³Apparent density (kg/m³); ⁴Radial Expansion Ratio

Tukey's multiple comparison test grouped the modulus of elasticity results into two subsets, presenting significant differences between TP3 (138,31 MPa) and TP1 (175,09 MPa) treatments, being the combinations with the lowest and highest modulus of elasticity values respectively. Apart from these, there were no significant differences between the other treatments. Given that the interaction of the factors evaluated generated significant changes in this response variable, it can be stated that temperature was the factor with the greatest impact, according to what was obtained in the analysis of Anova variance and also by the highest statistic F. Experimental results for modulus of elasticity are presented in Table 6.

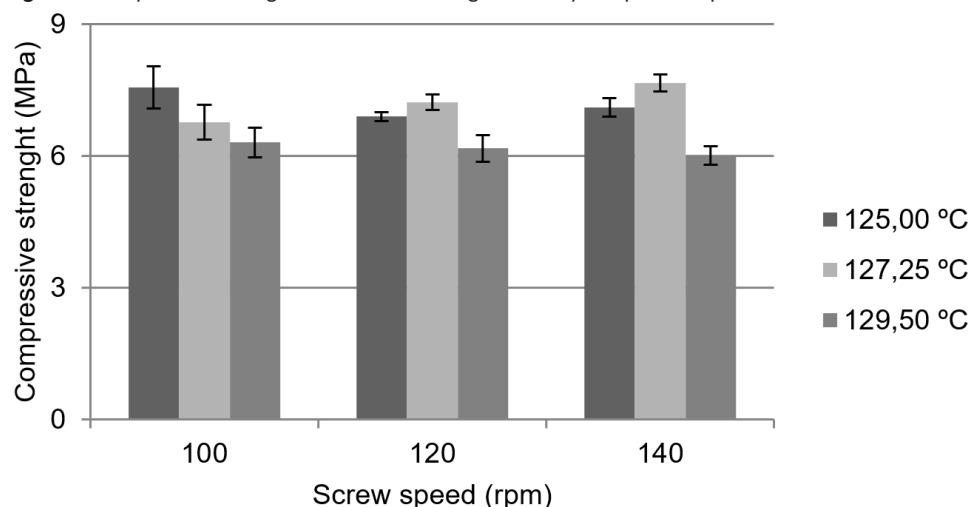
Table 6. Results of modulus of elasticity in experimental design 2.

TP	Screw speed: Profile temperature	Modulus of elasticity (MPa)
TP1	100:125,00	175,09±18,73 ^b
TP2	120:125,00	142,73±8,13 ^{a,b}
TP3	140:125,00	138,31±5,45 ^a
TP4	100:127,25	151,20±14,72 ^{a,b}
TP5	120:127,25	165,71±11,38 ^{a,b}
TP6	140:127,25	168,68±21,00 ^{a,b}
TP7	100:129,50	148,42±10,47 ^{a,b}
TP8	120:129,50	158,37±14,12 ^{a,b}
TP9	140:129,50	145,76±4,82 ^{a,b}

The results of compressive strength, for the Tukey test, were distributed in five subsets, presenting a significant difference between TP9 and TP2 treatment, TP3, TP5, TP1 and TP6. The lowest value (6,01 MPa) corresponding to the TP9 treatment and the highest value (7,67 MPa) of the TP6 treatment. According to Anova, the interaction speed and temperature profile was the one that most impacted the behavior of this variable. In Figure 2, it can be observed the change in the behavior of the compressive strength against the different combinations of screw speed and temperature.

In terms of apparent density, two subsets were found, in the first subset the lowest value of this response variable corresponding to the TP7 treatment was presented (675 kg/m³), however this treatment only presented signifi-

Figure 2. Compressive strength behavior according to velocity-temperature profile combinations.



cant differences compared to the TP2, TP5 and TP6 treatments, the latter being the one in which the density was higher (781 kg/m^3). In order to determine some type of trend with temperature profile 2 and a higher speed level, the density of the material became higher, so much so that the TP6 treatment had a higher density than the TP7 treatment. Experimental results for apparent density and radial expansion ratio are presented in Table 7.

In this sense, higher levels of screw speed represented higher values of compressive strength for the intermediate temperature profile ($127,25^\circ\text{C}$), being even higher than those found for processed samples with higher temperature profile. Accordingly, a higher temperature resulted in a lower compression strength value. This can be related to what was stated by [25] when identifying that at high temperatures they also favor coalescence and decrease the density of the number of cells; which allows inducing a reduction in the mechanical properties, since when there are higher densities they imply higher resistances to compression [20].

With respect to the results obtained from the expansion index, it was found that only between TP6 and TP3 treatments there were significant differences, reporting respectively the lowest (5,53) and highest (6,35) value, both processed at a speed of 140 rpm. According to the analysis of Anova variance, the interaction of the factors had greater significance against this response variable, hence, the temperature profile with its individual action could have influenced to a greater extent the action of this interaction.

Table 7. Results of apparent density and radial expansion ratio in experimental design 2.

TP	1	Aparent density (kg/m^3)	Radial expansion ratio
TP1	100:125,00	$703,67 \pm 0,03^a$	$5,74 \pm 0,36^{a,b}$
TP2	120:125,00	$727,00 \pm 0,02^{a,b}$	$5,96 \pm 0,25^{a,b}$
TP3	140:125,00	$682,00 \pm 0,03^a$	$6,35 \pm 0,41^b$
TP4	100:127,25	$707,33 \pm 0,01^a$	$5,97 \pm 0,18^{a,b}$
TP5	120:127,25	$731,00 \pm 0,01^{a,b}$	$5,86 \pm 0,10^{a,b}$
TP6	140:127,25	$781,00 \pm 0,03^b$	$5,53 \pm 0,33^a$
TP7	100:129,50	$675,00 \pm 0,03^a$	$6,25 \pm 0,13^{a,b}$
TP8	120:129,50	$678,30 \pm 0,02^a$	$5,93 \pm 0,32^{a,b}$
TP9	140:129,50	$692,67 \pm 0,04^a$	$5,74 \pm 0,18^{a,b}$

¹Screw speed (rpm): Profile temperature ($^\circ\text{C}$)

A general analysis of the treatment with respect to the response variables, it was evidenced that the behavior of the material with respect to the compressive strength was noted as the TP6 treatment offered 7,67 MPa, being 0,11 MPa above the TP1 treatment, so much so that according to Tukey's test, these two treatments were part of the same subgroup.

With respect to density, it was the TP6 treatment that yielded a material with higher density, with significant differences compared to that shown by the TP1 treatment, which although it did not represent the combination that offered the lowest density, if it was within the same subgroup of the treatment as if it were, such as the TP7 treatment. As regards the elasticity modulus and expansion index, there were no significant differences between the two, being these ones that showed the highest modulus of elasticity, the opposite case with the expansion index, where they showed lower levels.

It is possible that the lower results in the upper temperature profile are due to the fact that, if temperature is higher excessively, then melt strength of the polymer can be low-inducing cell rupture [28], which could have generated a significant reduction in the values of compressive strength. In addition, as a higher statistical value F was found, it showed that the effects on compressive strength were more due to the action of temperature.

The upper density value was found for the combination of 140 rpm and 127;25°C, i.e. for the upper screw speed level, possibly due to the interaction with the intermediate temperature profile, under which the viscosity may not have been significantly reduced thus preventing further expansion and therefore lower apparent density values [29]. At higher temperature profiles, the apparent density decreased, which coincides with what was reported by [15] who reported that the extrusion temperature could generate changes in cell wall thickness and viscosity, causing a reduction in the solid phase of the polymer, thus decreasing its density.

From the previous, it was determined that the TP1 treatment, that is, the combination of temperature profile 1 (125,00°C) at a screw speed of 100 rpm, corresponded to the relevant extrusion conditions to obtain the expanded one. As it offered high values of compressive strength without representing a material with the highest densities.

In foams made from thermoplastic cassava starch, obtained by single screw extrusion, apparent density values between 473 and 673 kg/m³ and radial expansion ratios between 4,5 and 7,8 were reported [30]. Other authors reported values from 6,10 to 6,14 for radial expansion and densities from 110 to 430 kg/m³ for cassava starch foams with cellulose fibers [21]. Also [15] reported that the foam density of starch-based products ranged from 18,7 to 30,5 kg/m³, 2,5 times denser than foam based on expanded polystyrene. Although commercial products like Ethafoam220 is a closed cell polyethylene foam of medium density 35 kg/m³ [31].

Mixtures of potato starch with poly(vinyl alcohol) presented apparent densities from 175 to 295 kg/m³ and modulus of elasticity from 206 to 414 MPa [19]. Other studies report results from 133 to 935 MPa for compressive strength in potato starch and poly(vinyl alcohol) foams using the extrusion-cooking technique [11]. Other results of foams made from potato flour showed expansion ratios from 1,61 to 3,49 with compressive strength from 0,29 to 1,35 MPa [27]. Compared to these studies, the results obtained with foams made from starch and cassava flour showed high density (675-781 kg/m³), similar expansion rates (5,53-6,35), low compressive strength rates (6,01-7,67 MPa) and low modulus of elasticity rates (138-175 MPa).

However, future work around starch-based materials can have different perspectives: decreasing cost and improving performance [32], where application of raw materials like cassava flour can help to increase applications and impact for use of this kind of materials. Further efforts will be required to enhance the functional properties of materials developed with this type of raw material, as mixtures with other polymers such as polylactic acid, poly(vinyl alcohol) and use of twin-screw extrusion.

CONCLUSIONS

It was possible to obtain an expanded matrix using starch and cassava flour as raw materials using the simple screw extrusion process. The interaction of the factors flour content and moisture generated significant effect on the mechanical and physical properties of the material, finding the highest values of compressive strength with a combination of 15% flour content, 22% moisture. The temperature profile and screw speed factors interacted significantly on the mechanical and physical properties of the extruded material. The development of an expanded material obtained by extruding a single screw of starch, cassava flour and other additives resulted in a rigid matrix, with high density and low compressive strength, compared to other investigations of biodegradable foams for loose filling.

REFERENCES

- [1] FAN-LONG, JIN; ZHAO, MIAO; PARK, MIRA; SHOO-JIN, PARK. Recent trends of foaming in polymer processing: A Review. *Polymers (Basel)*, v. 11, n. 6, 2019, p. 1-23.
<https://doi.org/10.3390/polym11060953>
- [2] LIU, F.; LU, K.; SHAO, Z.; SHI, K.; LIN, X.; LIU, H.; YU, L. Thermal and rheological properties of starch-based materials. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 479, n. 1, 2019, p. 1-4.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/479/1/012006>
- [3] CHIARATHANAKRIT, CHALIGA; MAYAKUN, JARWAN; PRATHEP, ANCHANA; KAEWTATIP, KAEWTA. Comparison of the effects of calcified green macroalga (*Halimeda macroloba* Decaisne) and commercial CaCO_3 on the properties of composite starch foam trays. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 121, 2019, p. 71-76.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.191>
- [4] MARTINS-MACHADO, CAROLINE; BENELLI, PATRICIA; TESSARO, ISABEL-CRISTINA. Study of interactions between cassava starch and peanut skin on biodegradable foams. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 147, n. 15, 2020, p. 1343-1353.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.098>
- [5] LU, HAIQIN; GUO, LIYUN; ZHANG, LICHAO; XIE, CAIFENG; LI, WEN; GU, BI; LI, KAI. Study on quality characteristics of cassava flour and cassava flour short biscuits. *Food Science and Nutrition*, v. 8, n. 1, 2019, p. 521-533.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1334>
- [6] ODEY-DORADA, NKA; YOUNG-LEE, WON. Evaluation of the quality characteristics of flour and pasta from fermented cassava roots. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 55, n. 2, 2020, p. 813-822.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.14364>
- [7] SURYANTO, H.; RAHMAWAN, A.; SOLICHIN; SAHANA, R.; MUHAJIR, M.; YANUHAR U. Influence of carrageenan on the mechanical strength of starch bioplastic formed by extrusion process. *International Conference on Mechanical Engineering Research and Application*, v. 494, n. 1, 2019, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/494/1/012075>
- [8] GEORGES, ABINADER; LACOSTE, CATHERINE; DAMIEN, ERRE. Effect of formulation and process on the extrudability of starch-based foam cushions. *Industrial Crops and Products*, v. 115, 2018, p. 306-314.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.001>
- [9] HASSAN, MOHAMMAD; LE GUEN, MARIE; TUCKER, NICK; PARKER, KATE. Thermo-mechanical, morphological and water absorption properties of thermoplastic starch/cellulose composite foams reinforced with PLA. *Cellulose*, v. 26, n. 7, 2019, p. 4463-4478.
<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02393-1>

- [10] CRUZ-TIRADO, JAM-PIER; VEJARANO, RICARDO; TAPIA-BLÁCIDO, DELIA; ANGELATS-SILVA, LUIS; SICHE, RAÚL. The addition of sugarcane bagasse and asparagus peel enhances the properties of sweet potato starch foams. *Packaging Technology and Science*, v. 32, n. 5, 2019, p. 227-237.
<https://doi.org/10.1002/pts.2429>
- [11] COMBRZYŃSKI, MACIEJ; MATWIJCZUK, ARKADIUSZ; WÓJTOWICZ, AGNIESZKA; ONISZCZUK, TOMASZ; KARCZ, DARIUSZ; SZPONAR, JAROSLAW; NIEMCZYNOWICZ, AGNIESZKA; BOBER, DARIUSZ; MITRUS, MARCIN; KUPRYANIUK, KAROL; STASIAK, MATEUSZ; DOBRZAŃSKI, BOHDAN; ONISZCZUK, ANNA. Potato starch utilization in ecological loose-fill packaging materials—sustainability and characterization. *Materials*, v. 13, 2020, 1390.
<https://doi.org/10.3390/ma13061390>
- [12] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). ASTM D618-13: Standard Practice for Conditioning Plastics for Testing. Pennsylvania (USA): 2013, 4 p.
- [13] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). ASTM D3748-19: Standard Practice for Evaluating High-Density Rigid Cellular Plastics. Pennsylvania (USA): 2019, p. 2.
- [14] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). ASTM D1622/D1622M-14: Standard Test Method for Apparent Density of Rigid Cellular Plastics, Pennsylvania (USA): 2014, p. 4.
- [15] MITRUS, MARCIN; MOSCICKI, LESZEK., Extrusion-cooking of starch protective loose-fill foams. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 92, n. 4, 2014, p. 778-783.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.027>
- [16] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). ASTM D695-15: Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics. Pennsylvania (USA): 2015, p. 8.
- [17] YANG, ZHIGUAN; GRAIVER, DANIEL; NARAYAN, RAMANI., Extrusion of humidity-resistant starch foam sheets. *Polymer Engineering & Science*, v. 53, n. 4, 2013, p. 857-867.
<https://doi.org/10.1002/pen.23326>
- [18] LINGHAN, MENG; HONGSHENG, LIU; LONG, YU; QINGFEI, DUAN; LING, CHEN; FENGSONG, LIU; ZEZHENG, SHAO; KELEI, SHI; XIANYANG, LIN. How water acting as both blowing agent and plasticizer affect on starch based foam. *Industrial Crops & Products*, v. 134, 2019, p. 43-49.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.056>
- [19] COMBRZYŃSKI, MACIEJ; MOŚCICKI, LESZEC; KWAŚNIEWSKA, ANITA; ONISZCZUK, TOMASZ; WÓJTOWICZ, AGNIESZKA; KRĘCISZ, MAGDALENA; SOŁOWIEJ, BARTOSZ; GŁADYSZEWSKA, BOZENA; MUSZYŃSKI, SIEMOWIT. Effect of PVA and PDE on selected structural characteristics of extrusion-cooked starch foams. *Polímeros*, v. 28, n. 1, 2018, p. 76-83.
<https://doi.org/10.1590/0104-1428.02617>
- [20] LÓPEZ-GIL, A.; SILVA-BELLUCI, F.; VELASCO, D.; ARDANUY, N.; RODRIGUEZ-PEREZ, M., Cellular structure and mechanical properties of starch-based foamed blocks reinforced with natural fibers and produced by microwave heating. *Industrial Crops and Products*, v. 66, 2015, p. 194-205.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.025>
- [21] KASANGSRI, NATAPON; KOWALSKI, RYAN; KERDCHOECHUEN, ORAPIN; LAOHAKUNJIT, NATTA; GANJYAL, GIRISH. Cellulose fiber enhances the physical characteristics of extruded biodegradable cassava starch foams. *Industrial Crops and Products*, v. 142, 2019, 111810.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111810>
- [22] MOO-TUN, NORA; IÑIGUEZ-COVARRUBIAS, IÑIGUEZ; VALADEZ-GONZALEZ, A. Assessing the effect of PLA, cellulose microfibers and CaCO₃ on the properties of starch-based foams using a factorial design. *Polymer Testing*, v. 86, 2020, 106482.
<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106482>
- [23] LEUNG, SIU; WONG, ANSON; WANG, LILAC; PARK, CHUL. Mechanism of extensional stress-induced cell formation in polymeric foaming processes with the presence of nucleating agents. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 63, 2012, p. 187-198.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.12.018>

- [24] ABDUL-AZAM, FARAH-ATIQAT; NISHATA-ROYAN, RAJEDRAN-ROYAN; YUHANA, NI-YULIANA; MOHD-RADZUAN, NABILAH-AFIQAH, AHMAD, SAHRIM; ABU-BAKAR, SULONG. Fabrication of porous recycled HDPE biocomposites foam: effect of rice husk filler contents and surface treatments on the mechanical properties. *Polymers (Basel)*, v. 12, n. 2, 2020, P. 475.
<https://doi.org/10.3390/polym12020475>
- [25] BONIN, M. An investigation into the properties of starch-based foams [Ph.D. Thesis Doctor of Philosophy]. London (United Kingdom): Brunel University, School of Engineering and Design, 2010, 247 p.
- [26] COMBRZYŃSKI, M.; MOŚCICKI, L.; MITRUS, M.; KUPRYANIUK, K.; ONISZCZUK, A. Application of extrusion-cooking technique for foamed starch-based materials. *BIO Web of Conferences*, 10, 2018, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20181001004>
- [27] BINTIIN, R.; PUNTAWONG, P.; THIRAPHATTARAPHUN, L. Properties of potato flour-based loose-fill foams. *Materials Today: Proceedings*, v. 17, 2019, p. 2078-2082.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.256>
- [28] ALTAN, M. In: Recent research in polymerization. London (United Kingdom): InTechOpen, 2018, p. 117-137.
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71083>
- [29] FOLAYASO-FAYOSE, TITILOLA. Expansion characteristics of selected starchy crops during extrusion. *The West Indian Journal of Engineering*, v. 35, n. 2, 2013, p. 58-64.
- [30] DELGADO, KAREN; ALBÁN-BOLAÑOS, PEDRO; MONTILLA-BUITRAGO, CAMILO-ELIAS; CERÓN-MOSQUERA, ALCY-RENE; VILLADA-CASTILLO, HÉCTOR SAMUEL. Evaluación de la densidad aparente e índice de expansión radial en espumas de almidón termoplástico. *Agronomía Colombiana*, v. 34, (Supl.1), 2016, p. S104-S106.
- [31] CORDERO, MATEO; ROUILLARD, VINCENT; MILVERTON, JUSTIN. An evaluation of the mechanical performance of extruded wheat starch loose fill. *Packaging Technology and Science*, v. 32, n. 10, 2019, p. 511-521.
<https://doi.org/10.1002/pts.2465>
- [32] JIANG, TIANYU; DUAN, QINGFEY; ZHU, JIAN; LIU, HONGSHENG; YU, LONG. Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, v. 3, n. 1, 2020, p. 8-18.
<https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.003>

Evaluación de parámetros zootécnicos en terneros suplementados con un alimento fermentado en estado sólido*

Evaluation of zootechnical parameters in calves supplemented with a fermented food in solid state

Avaliação de parâmetros zootécnicos em berços suplementados com alimento fermentado em estado sólido

RODRÍGUEZ-SALGADO, ANGELA-MIREYA¹; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO¹;
BORRAS-SANDOVAL, LUIS-MIGUEL²

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 17 de Abril 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Título del proyecto de origen: "Evaluación del desarrollo ruminal y de algunos parámetros productivos en terneros alimentados con una dieta obtenida por fermentación en estado sólido (FES) papa: zanahoria". Financiación: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y COLCIENCIAS. Culminación: diciembre de 2019.

1 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de investigación en Bioquímica y Nutrición Animal (GIBNA). MSc. en Ciencias Biológicas. Tunja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0862-3478>

2 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de investigación en Bioquímica y Nutrición Animal (GIBNA). Ph.D. en Ciencias Veterinarias. Tunja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3284-027X>

Correspondencia: carlos.rodriguez@uptc.edu.co

Cómo citar este artículo: RODRÍGUEZ-SALGADO, ANGELA-MIREYA; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO, BORRAS-SANDOVAL, LUIS-MIGUEL. Evaluación de parámetros zootécnicos en terneros suplementados con un alimento fermentado en estado sólido. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 153-166. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)153-166](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)153-166)

RESUMEN

El crecimiento de la población mundial ha causado un aumento en la demanda de alimentos de origen animal, en donde el ganado bovino se ha convertido en una de las especies más importantes económicamente hablando, a raíz de los altos costos de concentrados se ha generado interés en la búsqueda de alternativas de alimentación. El objetivo de este trabajo fue determinar el comportamiento de algunos parámetros zootécnicos en terneros suplementados con diferentes inclusiones de FES papa- zanahoria. Se establecieron cuatro grupos con una alimentación base de leche y forraje, dos grupos fueron suplementados con 6 y 9 g/kg/PV de alimento FES papa- zanahoria, un grupo con 6 g de concentrado balanceado y un grupo control. Las variables evaluadas fueron ganancia de peso, altura de la cruz y consumo de alimento. Los animales del T2 y T3, alcanzaron un peso final estadísticamente superior ($p < 0,05$) en relación a los animales del grupo control; la mayor altura a la cruz se logró con el T2, reportando una altura de 85 cm. La suplementación con 6 g de alimento FES, resulta ser una alternativa de alimentación, al obtener mejores resultados en los parámetros zootécnicos y siendo más económica.

ABSTRACT

The growth of the world population has caused an increase in the demand for food of animal origin, where cattle have become one of the most important species economically speaking, due to the high costs of concentrates, interest has been generated in the search for feeding alternatives. The objective of this work was to determine the behavior of some zoo technical parameters in calves supplemented with different of FES potato-carrot inclusions. Four groups were established with a basic diet of milk and forage, two groups were supplemented with 6 and 9 g/kg/PV of FES-carrot feed, one group with 6 g of balanced concentrate and the control group. The variables evaluated were weight gain, height at the withers and food consumption. The animals of T2 and T3 reached a statistically higher final weight ($p < 0,05$) in relation to the animals of the control group; the highest height at the withers was achieved with the T2, reporting a height of 85 cm. Supplementation with 6 g of FES feed turns out to be a feeding alternative, obtaining better results in zoo technical parameters and being more economical.

RESUMO

O crescimento da população mundial causou um aumento na demanda por alimentos de origem animal, onde o gado se tornou uma das espécies mais importantes economicamente falando, Devido ao alto custo dos concentrados, foi gerado interesse na busca de alternativas alimentares. O objetivo deste trabalho foi determinar o comportamento de alguns parâmetros zootécnicos em bezeros suplementados com diferentes inclusões de cenoura-batata FES. Quatro grupos foram estabelecidos com uma dieta básica de leite e forragem, dois grupos foram suplementados com 6 e 9 g/kg/PV de ração FES-cenoura, um grupo com 6 g de concentrado balanceado e um grupo controle. As variáveis avaliadas foram ganho de peso, estatura na cernelha e consumo alimentar. Os animais de T2 e

PALABRAS CLAVES:

Alimentación animal; Forraje; Papa; Zanahoria; Alternativa nutricional; Alimento conservado.

KEYWORDS:

Animal feed; Forage; Potato; Carrot; Nutritional alternative; Preserved food.

PALAVRAS-CHAVE:

Alimentação animal; Forragem; Batata; Cenoura; Alternativa nutricional; Alimento conservado.

T3 atingiram um peso final estatisticamente maior ($p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle; a altura mais alta na cernelha foi alcançada com o T2, relatando uma altura de 85 cm. A suplementação com 6 g de alimentação FES acaba sendo uma alternativa alimentar, obtendo melhores resultados em parâmetros zootécnicos e sendo mais econômica.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento acelerado y continuo de la población mundial, la concentración en las ciudades y el incremento de los ingresos ha generado el aumento de la demanda de alimentos, presentándose implicaciones de alto impacto en la producción, ya que se deberá producir más alimentos de origen animal con baja disponibilidad de recursos naturales [1]. La producción de carne bovina en Colombia integra uno de los sectores de mayor importancia económica, que le garantiza al país el autoabastecimiento de productos cárnicos, sin embargo, la baja tasa de crecimiento de los animales, altos costos de concentrados y cambio climático limita esta actividad.

La creciente demanda de productos animales brinda a todos los involucrados en la producción de rumiantes implementar el uso estratégico de la nutrición para mejorar la salud y la producción, ya que se estima que esta es uno de los factores más importantes en el desarrollo productivo de los animales, además de contribuir en hasta el 70% del costo total de producción [2], debido a esto, se ha visto la obligación de buscar e implementar continuamente estrategias nutricionales alternativas para la suplementación de proteína y materia seca, de calidad y económicamente rentables, supliendo los requerimientos nutricionales y mejorando los parámetros zootécnicos [3].

La elaboración de alimentos mediante fermentación en estado sólido (FES) constituye una alternativa viable, debido a que permite el aprovechamiento de subproductos de residuos agroindustriales, lo que contribuye a mejorar la dieta de los rumiantes, aumentando los indicadores productivos y reduciendo la contaminación ambiental [4]. En Boyacá, al ser un departamento con vocación agrícola, se evidencian cantidades representativas de residuos pos cosecha que generan pérdidas económicas para los productores y pueden actuar como agentes potencialmente contaminantes; por esta razón, se ha visto la necesidad de implementar tecnologías para su aprovechamiento llegándose a estudiar la inclusión de diferentes residuos de papa, zanahoria, manzana, durazno y chontaduro en un preparado FES como alternativa ecoeficiente para la alimentación animal [5,6,7,8,9].

La ingesta de alimento sólido en terneros es un factor importante en su desarrollo ruminal permitiendo realizar la transición de un animal pre-rumiante a rumiante funcional, la utilización de residuos agroindustriales, productos y subproductos agrícolas locales ricos en proteínas y nutrientes de alto valor energético, puede constituir una alternativa para mejorar el rendimiento animal, además de obtener reducción en los costos de producción, sin embargo, en la actualidad se evidencia controversia respecto a la composición y calidad del alimento iniciador. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la suplementación de inclusiones de FES papa- zanahoria sobre algunos parámetros zootécnicos en terneros.

MÉTODO

Localización el estudio

La investigación fue realizada en la finca Santa Bárbara, ubicada en el Municipio de Gachantivá, Departamento de Boyacá perteneciente a la provincia de Alto Ricaurte, ubicada 73° 33'00" de longitud y 5°44'50" de latitud, a una altura de 2450 msnm, temperatura promedio de 16°C y humedad relativa del 64%.

Manejo de los animales

Se seleccionaron terneros de diferentes cruces de Holstein ($n=16$) provenientes de ganaderías especializadas, con 3 días de edad, con un criterio de selección de homogeneidad de peso. Se inició el suministro de leche a ra-

zón de 4 L en dos tomas (6:00 y 18:00 horas) a una temperatura de 37 a 40°C por medio de un biberón especial para este tipo de trabajo.

A la semana de vida se inició un proceso de acostumbramiento a la dieta, proceso que tuvo una duración de 7 días, donde se inició con el suministro de 30 g/día de alimento FES y concentrado comercial para los tratamientos T2 y T3 respectivamente, con un aumento diario gradual hasta completar los 6 g/kg/PV, para el T4 se suministró inicialmente 50 g/día de alimento FES con un aumento gradual diario igual hasta completar los 9 g/kg/PV, esto con el fin de garantizar el consumo de alimento en los diferentes tratamientos. Los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones medio ambientales con una temperatura promedio de 16°C y humedad relativa de 64%, manejando un modelo de semiestabulación, con el fin de tener un mejor control sobre las unidades experimentales; se contaban con pequeños potreros con una base forrajera de pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*), adicionalmente, se les suministró heno de pangola (*Digitaria eriantha*) y cuba 22 (Cuba CT-115); el consumo de materia seca en base en forraje se estimó en un 2,8% de su peso vivo, el suministro de agua fue ad libitum y a todos los animales se les brindaron los cuidados necesarios para mantener su integridad y bienestar.

Tratamientos

Los terneros (n=16) fueron asignados aleatoriamente a 4 tratamientos con el factor de inclusión de alimento FES y concentrado balanceado comercial, la suplementación se inició en la segunda semana de vida y se llevó hasta la semana 10 con el fin de coincidir con la fase de transición de los rumiantes.

Tratamiento 1 (T1) Control (Leche-Forraje). Suministro de leche y forraje a voluntad.

Tratamiento 2 (T2) Leche/Forraje/FES(6g/kg/PV). Suministro de leche y forraje como base, más 6 g/kg de peso vivo de FES papa-zanahoria.

Tratamiento 3 (T3). Leche/Forraje/Concentrado(6g/kg/PV): Suministro de leche y forraje como base, más 6 g/kg de peso vivo de alimento concentrado comercial.

Tratamiento 4 (T4) Leche/Forraje/FES(9g/kg/PV). Suministro de leche y forraje como base, más 9 g/kg de peso vivo de FES papa- zanahoria.

Como alimento concentrado (cuadro 1) se empleó un alimento extruido comercial para etapa de preiniciación e iniciación formulado para la crianza de terneras. En cuanto al FES (cuadro 1), se usó uno FES papa- zanahoria elaborado a razón de 25% papa, 25% zanahoria, 16% salvado de trigo, 16% repila de trigo, 5% palmiste, 2% urea, 0,5% sulfato de magnesio, 0,5% carbonato de calcio, 5% inoculo BAL y 5% Melaza, este alimento se usó a las 48 horas de preparado, con base en investigaciones previas que demuestran su estabilidad y calidad nutricional [9].

Cuadro 1. Análisis garantizado del Alimento FES y del concentrado balanceado comercial en base a materia seca.

Nutriente	FES 25:25 papa:zanahoria (%)	Concentrado Comercial® (%)
Proteína Cruda	27,80	18,0
Grasa	6,20	2,5
Fibra Cruda	9,00	12,0
Cenizas	6,60	10,0
Humedad	52,54	13,0
Materia seca	47,46	87,0

Parámetros productivos a evaluar

Como parámetros zootécnicos se midió la ganancia de peso total, ganancia de peso diario, consumo de alimento y altura a la cruz. Estas mediciones se iniciaron antes de realizar la suplementación y continuaron cada quince días hasta completar el tiempo del experimento que correspondió a la semana 10 de vida.

Ganancia de peso. Los animales fueron pesados en una báscula electrónica en las horas de la mañana en ayuno. Con estos datos se determinó la ganancia diaria de peso (g/día) y la ganancia de peso total (kg) en el tiempo de estudio.

Altura a la cruz (cm). La medición se hizo con el animal en posición tal que los miembros se encontraran aplomados con el eje central. La medida se tomó con un hipómetro en forma perpendicular desde el piso hasta la porción más sobresaliente de los cartílagos de las escapulas (cruz) por la cara posterior de los miembros anteriores, siguiendo la metodología descrita por Inchausti y Tagle [10], con el fin de determinar su crecimiento en centímetros.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado. Los datos fueron sometidos a los supuestos de normalidad a través del estadístico de Shapiro-Wilk y homogeneidad por prueba de Levene. Se utilizó la prueba de comparación de promedios de Tukey con un nivel de significancia del 5%. El paquete estadístico a usado fue SPSS versión 23.

RESULTADOS

Calidad nutricional de los alimentos

Se evidenció que, en cuanto a los aportes nutricionales con base en la materia seca, el alimento obtenido por FES fue de mejor calidad que el concentrado balanceado comercial (Cuadro 1), mostrando mayor porcentaje de proteína, sin embargo, presentó una notable diferencia en la MS, motivo por el cual el consumo de alimento se calculó con base en la materia seca (CMS) y posteriormente se convirtió a consumo de alimento fresco (CAF) (Cuadro 2).

El alto contenido de proteína cruda en el alimento FES se relaciona con el aporte de nitrógeno dado por la úrea, a la reducción de carbohidratos y a la producción de proteínas microbianas durante el proceso de fermentación [11], sin embargo, estos niveles altos pueden relacionarse con la pérdida de materia seca permitiendo que la proteína pueda concentrarse [12], todo lo anterior evidenciado en este estudio. Este comportamiento fue comprobado por Fonseca *et al.* [5] quienes informaron que las diferentes inclusiones de zanahoria, nabo, tuza, morera y cascarilla de café mostraron un aumento promedio de cuatro veces el valor inicial a las 48 y 72 horas de fermentación; por otra parte, Caicedo *et al.* [13] indicaron que el contenido de proteína del tubérculo de taro presentó un incremento de 13,95% en relación con el tubérculo en estado natural que fue de 8,48%, sin embargo, Fonseca *et al.* [14] reportaron que bajos niveles de proteína asociados al almidón acelera el proceso de gelatinización lo cual es ideal para aumentar la digestibilidad de estos nutrientes.

Consumo de alimento

El suministro del concentrado balanceado estuvo acorde a lo reportado por Yohe *et al.* [15] quienes señalaron un consumo de aproximadamente 100 g/animal/día en la primera semana de vida y de 1000 g/animal/día a las 8 a 10 semanas, la cantidad de alimento suministrado se ajustó cada vez que se realizaba un pesaje.

En el cuadro 2 se puede observar que a medida que avanza la edad de los animales, en el T4 se evidencia un mayor consumo de alimento presentándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) con respecto a los demás tratamientos.

Cuadro 2. Consumo del FES papa: zanahoria y concentrado balanceado comercial.

Intervalo (días)	Tratamiento	Peso Inicial (Kg)	CMS* (g)	CAF** (g)
Intervalo 1 (14-27 d)	T1***	34,83	0	0
	T2	35,75	214,5 a	451,6 b
	T3	36,15	216,9 a	249,3 a
	T4	35,88	322,9 b	679,8 c
Intervalo 2 (28-41 d)	T1***	40,68	0	0
	T2	41,73	250,4 a	527,1 b
	T3	41,9	251,4 a	289,0 a
	T4	42,63	383,7 b	807,7 c
Intervalo 3 (42-55 d)	T1***	40,95	0	0
	T2	45,9	275,4 a	579,8 b
	T3	46,18	277,1 a	318,5 a
	T4	45,75	411,8 b	866,8 c
Intervalo 4 (56-70 d)	T1***	41,63	0	0
	T2	50,55	303,3 a	638,5 b
	T3	51,73	310,4 b	356,8 a
	T4	50,43	453,9 c	955,5 c

*Consumo de materia seca

**Consumo de alimento fresco

***No se calculó CMS y CAF debido a que no consumieron una dieta suplementaria

Promedios con letras distintas en la columna, indican una diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Para el primer intervalo es importante aclarar que los individuos ya habían recibido 7 días de acostumbramiento a la dieta, donde todos los animales consumieron la cantidad correspondiente para cada tratamiento sin presentar rechazo a los mismos; sin embargo, los animales del T4 no consumieron la totalidad del alimento ofrecido, a diferencia de los animales de los otros tratamientos en donde el consumo fue total; este mismo comportamiento se evidenció para el intervalo 2 y 3; finalizando la etapa experimental es decir en el intervalo 4, los animales del T4 consumieron todo el alimento.

En este estudio se usaron dosis bajas del alimento FES debido a que la presentación de un pH bajo en rumiantes en etapa de transición puede llegar a ser perjudicial para su desempeño, aumentando el riesgo de acidosis ruminal y la disminución de la ingesta de alimentación inicial [16], además de generar una mayor demanda de energía que reduciría la cantidad de energía disponible para el crecimiento, afectando la eficiencia de la alimentación [17], lo que se evidenció con la dosis más alta del alimento FES.

Los datos de consumo con base en MS fueron inferiores a los reportados por otros investigadores que señalan consumos de 340 g/día aproximadamente en las primeras semanas de vida del animal y 1720 g/día post-destete [18]; por otro lado, Castro & Elizondo [19] reportan consumos a la semana 8 de 7030 g/semana de alimento en formato harina (1004,2 g/día), 5856 g/semana de concentrado en formato pellet (836,57 g/día) y de 6086 g/semana en concentrados balanceados en formato extrusado, correspondientes a 869,4 g/día.

Adicionalmente, se conoce que el consumo de alimento está estrechamente ligado con la presentación y composición del mismo tanto del tamaño como la frecuencia de alimentación; se ha informado que partículas finas genera una menor ingesta en relación con partículas de mayor tamaño en terneros [20], además la suplementación con forraje es un factor importante en la mejora del consumo [21]; por otro lado, Mirzaei *et al.* [22] demostraron que la suplementación con alimentos fermentados como el ensilaje de maíz mostraron una mayor ingesta inicial en relación con el heno de alfalfa e iniciadores granulados. Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que no se evidencia interacción entre la forma física de las dietas iniciales y la ingesta inicial del alimento [23].

Peso de los animales

El promedio de los pesos iniciales no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), sin embargo, a las 10 semanas de vida los animales de T2 y T3 alcanzaron un peso final estadísticamente superior ($p < 0,05$) en relación con el grupo control; en tanto que T4 no mostró diferencias con los otros tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Pesaje de los animales.

Tratamiento	Peso Inicial	Peso 28 días	Peso 42 días	Peso 56 días	Peso Final
T1	34,83±1,83 a	40,68±0,58 a	40,95±1,08 a	41,63±0,53 a	45,78±2,07 b
T2	35,75±2,05 a	41,73±1,96 a	45,90±1,93 a	50,55±2,17 a	59,00±2,47 a
T3	36,15±2,63 a	41,90±3,48 a	46,18±3,99 a	51,73±4,39 a	58,30±4,82 a
T4	35,88 0,80 a	42,63±0,93 a	45,75±0,58 a	50,43±0,61 a	56,9±1,14 ab

Promedios con letras distintas en la columna, indican una diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ($P < 0,05$); $\pm$ error estándar ($n=4$)

Beiranvand *et al.* [18] reportaron pesos que oscilaron entre 61,37 y 65,58 kg al destete con diferentes Interacciones de heno de alfalfa y propionato de sodio; por otro lado, con una alimentación de leche mediante un procedimiento convencional y descendente, se obtuvieron pesos de 65 y 79,11 kg a la séptima semana de vida respectivamente [24]; 66,61 y 73,24 kg con la adición de agua en el concentrado [25] y 60,4 y 59,4 kg con avena molida y entera a la 5 semana de vida [26], datos que fueron superiores a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, Castro y Elizondo [19] reportaron pesos que coincidieron, que oscilaron entre 49 y 58 kg a la 8 semana.

En contraste, Harris, *et al.* [27] mostraron un aumento significativo de los pesos de terneros suplementados con productos de fermentación de *Saccharomyces cerevisia* obteniendo 60,1 kg a los 35 días de vida. Se ha conocido que alimentos fermentados ejercen un efecto positivo sobre los índices productivos de terneros como la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia, permitiendo la acumulación de músculo corporal al proporcionar una mayor deposición de proteínas, todo esto debido a que el proceso de la fermentación mejora el valor nutricional al reducir agentes anti nutricionales, mejorar la digestibilidad y aumentar el contenido de proteínas y péptidos pequeños [28].

Las diferencias en los resultados pueden ser atribuidas a la variación en la composición de los alimentos suministrados, como relación forraje-concentrado, frecuencia de alimentación, tamaño de la partícula, además de las condiciones ambientales, edad y raza del animal. No obstante, es conocido que la cantidad y calidad del forraje suministrado es un factor importante en el desarrollo de los terneros ya que este puede mejorar el consumo de alimento sólido, la fermentación ruminal y el aumento del peso [29].

Ganancia diaria de peso

En el primer pesaje no se evidenciaron diferencias ($p < 0,05$) en las ganancias, sin embargo, en los pesajes a los 42 y 56 días los T2, T3 y T4, mostraron un aumento ($p < 0,05$) con respecto al grupo control. Para el pesaje a los 70 días, el T2 logró los mejores resultados con una ganancia diaria de peso de 603,6 g/día ($p < 0,05$) seguido del T3 con 469,6 g y T4 con 462,5 g/día. Para la ganancia diaria promedio, se observa que en los animales suplementados lograron valores superiores a los 450 g/día; a la vez, se evidencia que subir la dosis de FES no se traduce en un mayor rendimiento productivo, muy posiblemente se deba a alteraciones bioquímica en la cámara retículo ruminal (Cuadro 4).

En el Cuadro 4 se observa una notable disminución en la ganancia diaria de peso en el pesaje a los 42 días, esto pudo ser debido a la presencia de neumonías neonatales en los terneros, sin embargo, se observa que a los 70 días, los animales suplementados recuperaron los niveles de ganancia de peso.

Cuadro 4. Ganancia diaria de peso.

Tratamiento	Pesaje 28 días (g/d)	Pesaje 42 días (g/d)	Pesaje 56 días (g/d)	Pesaje 70 días (g/d)	Promedio (g/d)
T1	365,6±78,1 a	17,2±32,6 b	51,9±112,1 b	296,4±147,7 b	223,5±74,2 b*
T2	373,4±42,8 a	260,9±3,9 a	357,7±23,8 a	603,6±42,50 a	474,5±26,8 a*
T3	359,4±52,9 a	267,2±62,3 a	426,9±31,4 a	469,6±32,2 ab	452±47,7 a*
T4	419,5±10,8 a	195,3±25,6 a	359,6±13,0 a	462,5±71,5 ab	429,1±9,8 a*

Promedios con letras distintas en la columna, indican una diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ($P<0,05$); $\pm$ error estándar ($n=4$).

* Diferencia estadística significativa según la prueba de Duncan ($P<0,05$).

Silva *et al.* [30] indicaron que en la suplementación con leche y concentrado a voluntad la ganancia diaria fue mayor al aumentar los niveles de suministro de leche concentrado obteniendo 794 g/día y 886 g/día con las concentraciones superiores, lo que no concuerda con lo obtenido en este estudio ya que al aumentar la cantidad de suministro del alimento FES se observaron ganancias de peso inferiores; estos resultados pueden relacionarse con la posible presencia de diferencias en el pH ruminal, debido a que este alimento posee alta cantidad de carbohidratos fermentables lo que reduce rápidamente el pH ruminal y por ende la ingesta de alimentación conllevando a pérdidas en la ganancia de peso [26].

En estudios previos con alimentos fermentados demostraron que la ganancia diaria de peso fue superior a la obtenida en este estudio, con ganancias de 740 g/día y 796,9 g/día en la 8 semana de vida [28,31]. Kim *et al.* [32] reportaron que terneros alimentados con una dieta a base de harina de soja fermentada mejoraron la ingesta de alimento, el rendimiento del crecimiento, con ganancias aproximadas de 960 g/día a la semana 6 valor superior a lo observado en este estudio, esto debido a que los alimentos fermentados aportan más nutrientes. En este orden de ideas, se ha demostrado que animales alimentados con productos fermentados presentan mejores condiciones de salud [33,34], lo que explicaría las mayores ganancias de peso en los tratamientos T2, T3 y T4 en relación con el grupo control en el pesaje a los 42 y 56 días.

Ganancia Final de peso

Se observó que la ganancia de peso final durante el tiempo de estudio muestra diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los grupos de animales que recibieron suplementación y el grupo control. Es de resaltar que la mayor ganancia de peso se obtuvo con el T2, con un valor de 23,25 kg (Cuadro 5.).

Cuadro 5. Ganancia de peso final.

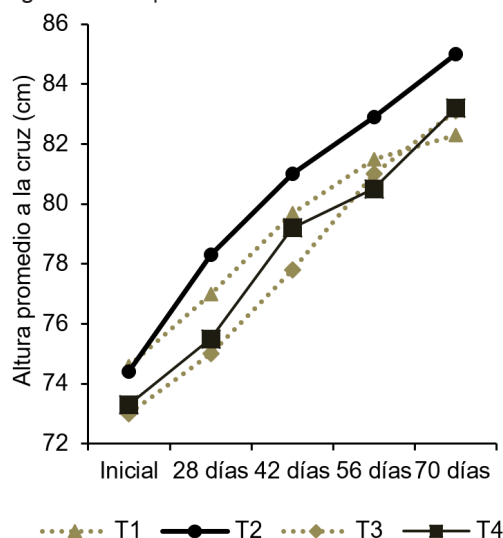
Tratamiento	Ganancia de peso final (Kg)
T1	10,95±3,63 b
T2	23,25±1,31 a
T3	22,15±2,33 a
T4	21,03±0,48 a

Promedios con letras distintas en la columna, indican una diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ($P<0,05$); $\pm$ error estándar ($n=4$).

Altura a la cruz

El comportamiento de la altura a la cruz en la Figura 1 muestra un patrón de crecimiento para los cuatro tratamientos.

Figura 1. Altura promedio a la cruz.



Los tratamientos suplementados presentaron mayores ganancias de altura ($p < 0,05$) con relación al grupo control, siendo el T2 y T3 los de mayor ganancia (Cuadro 6).

Cuadro 6. Ganancia promedio de la altura a la cruz.

Tratamiento	Ganancia Altura 28 días (cm)	Ganancia Altura 42 días (cm)	Ganancia Altura 56 días (cm)	Ganancia Altura 70 días (cm)	Ganancia Altura Final (Cm)
T1	2,4 b	2,2 b	1,9 b	0,8 b	7,7 b
T2	3,9 a	2,8 a	1,9 b	2,1ab	10,6 a
T3	2,0 b	2,8 a	3,3 a	2,1 ab	10,1 a
T4	2,2 b	2,7 a	2,3 ab	2,7 a	9,9 a

Promedios con letras distintas en la columna, indican una diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ($P < 0,05$); $\pm$ error estándar ($n=4$).

No obstante, estos valores difieren de los obtenidos por Khan *et al.* [35] quienes con consumo libre de heno alcanzaron 91,6 cm en la semana 8 y 95 cm en la semana 10; por otra parte, con la suplementación de harina de maíz fermentado a la semana 8 se obtuvo una altura promedio de 90,27 cm [31]. A diferencia, con la suplementación de 9% de harina de soja fermentada que obtuvo una altura de 81 cm en la semana 4 y 85 cm en la 8 semana, datos que concuerdan con los obtenidos por el T2; sin embargo, con 13,5% de harina de soja se obtuvieron alturas de 83,42 cm y 87,15 cm [28].

Consumo de alimento en relación al costo de la dieta

En el cálculo del valor de la dieta suministrada a los animales no se tuvo en cuenta el costo de forraje y leche en ninguno de los tratamientos, debido a que este se realizó en base con el consumo de alimento concentrado y

FES. El alimento FES papa:zanahoria tuvo un precio de \$ 439 COP/kg de alimento, en comparación con el concentrado balanceado comercial con un precio de \$1300 COP/kg de alimento; hasta este punto es notable que el alimento por FES tiene un costo 66,2% más bajo que el concentrado comercial; sumando a esto que su valor nutricional es más alto (Cuadro 7).

Los costos de alimentación relacionados en el Cuadro 8 corresponden a la sumatoria del costo de la alimentación durante el tiempo del experimento, los cuales se encuentran disgregados por intervalos de experimentación en el Cuadro 7.

Se evidencia que la alimentación con el T2, resulta ser más económica y productiva, ya que con esta se logran mejores ganancias de peso y de altura a la cruz; su uso representa un ahorro de \$9081,2 pesos en relación a la alimentación del T3.

La búsqueda de alimentos alternativos que suplan las necesidades nutricionales de los animales además de obtener resultados favorables en los parámetros productivos, es un factor importante en las producciones, ya que desde el punto de vista económico es imposible utilizar altos volúmenes de concentrados en la zona tropical.

Cuadro 7. Consumo de alimento en relación al costo de la dieta.

Intervalo (días)	Tratamiento	Peso Inicial (Kg)	CMS* (g)	CAF** (g)	Costo \$ (COP) Alimentación/ día	Costo \$ (COP)/ intervalo de tiempo
Intervalo 1 (14-27 d)	T1***	34,83	0	0	0	0
	T2	35,75	214,5 a	451,6 b	197,7	3163,2
	T3	36,15	216,9 a	249,3 a	324,1	5185,7
	T4	35,88	322,9 b	679,8 c	297,6	4762,1
Intervalo 2 (28-41 d)	T1***	40,68	0	0	0	0
	T2	41,73	250,4 a	527,1 b	230,8	3230,8
	T3	41,9	251,4 a	289,0 a	375,7	5259,2
	T4	42,63	383,7 b	807,7 c	353,6	4950,7
Intervalo 3 (42-56 d)	T1***	40,95	0	0	0	0
	T2	45,9	275,4 a	579,8 b	253,8	3299,8
	T3	46,18	277,1 a	318,5 a	414,0	5382,4
	T4	45,75	411,8 b	866,8 c	379,5	4933,5
Intervalo 4 (56-70 d)	T1***	41,63	0	0	0	0
	T2	50,55	303,3 a	638,5 b	279,5	4472,7
	T3	51,73	310,4 b	356,8 c	463,8	7420,6
	T4	50,43	453,9 c	955,5 a	418,3	6693,2

*Consumo de materia seca

**Consumo de alimento fresco

*** No se calcularon CMS, CAF y costos debido a que no consumieron una dieta suplementaria

Promedios con letras distintas en la columna, indican una diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Cuadro 8. Costo de la alimentación en el tiempo de experimentación

Tratamiento	Costo Alimentación Promedio / animal (COP)	Costo Alimentación Promedio / 4 animales (COP)
T1*	0	0
T2	14166,6	56666,3
T3	23247,8	92991,1
T4	21339,5	85358,2

*No se calcularon costos debido a que no consumieron una dieta suplementaria

González *et al.* [36] reportaron que el uso de plantas medicinales en la alimentación de becerras influyó en el incremento del consumo de alimento, mejora en la ganancia de peso y reducción en los costos de producción especialmente en los animales donde se administró extracto de cítricos.

CONCLUSIONES

La elaboración de un alimento mediante el proceso de fermentación en estado sólido permite mejorar el valor nutritivo, evidenciándose un aumento significativo en el porcentaje de proteína y otros nutrientes cuando hay un medio favorable, lo que posibilita la inclusión de subproductos orgánicos con el fin de disminuir los costos y aumentar el valor nutricional de estos para su uso en la alimentación animal. Por otra parte, la incidencia de enfermedades es menor cuando a los animales se les suministra un suplemento tipo FES, debido a que estos alimentos presentan un mayor número de microorganismos.

En este orden de ideas, el T2 que fue suplementado con 6 g/kg/PV del alimento FES papa:zanahoria, obtuvo los mejores resultados en relación con el consumo de alimento, ganancia de peso, peso final y alzada a la cruz; en términos económicos, este tratamiento fue más económico al representar un ahorro de \$9081,2 COP en relación con la suplementación con concentrado comercial, convirtiéndolo en una alternativa de alimentación para terneros reduciendo los costos de producción y aumentando la eficiencia de los animales. Sin embargo, el uso de dosis más altas del alimento FES, no mostro mejor resultado, siendo su rendimiento inferior al del concentrado comercial por lo cual se hace necesario realizar más estudios para determinar las cantidades óptimas a suministrar del alimento y diferentes subproductos agrícolas y pecuarios.

REFERENCIAS

- [1] CLOVIS-OLIVEIRA, KLEVERTON; FACHINELLO, ARLEI-LUIZ. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 56, n. 2, 2018, p. 195-212.
<https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>
- [2] CASTILLO-BADILLA, GLORIANA; VARGAS-LEITÓN, BERNARDO; HUECKMANN-VOSS, FRANK; ROMERO-ZÚÑIGA, JUAN-JOSÉ. Factores que afectan la producción en primera lactancia de vacas lecheras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, v. 30, n. 1, 2019, p. 209-227.
<http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.33430>
- [3] LÓPEZ-VARELA, DAVID. Caracterización bromatológica de pellets elaborados a partir de subproductos agropecuarios para la alimentación de bovinos. *Revista Tecnología en Marcha*, v. 30, 2017, p. 73-81.
<https://doi.org/10.18845/tm.v30i5.3226>
- [4] CHEBAIBI, SALIMA; LERICHE-GRANDCHAMP, MATILDE; BURGÉ, GRÉGOIRI; CLÉMENT, TIPHAINE; ALLAIS, FLORENT; LAZIRI, FATIHA. Improvement of protein content and decrease of anti-nutritional factors in olive cake by solid-state fermentation: A way to valorize this industrial by-product in animal feed. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 128, n. 3, 2019, p. 384-390.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.010>
- [5] FONSECA-LÓPEZ, DANIA; SAAVEDRA-MONTAÑÉZ, GABRIEL; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO. Elaboración de un alimento para ganado bovino a base de zanahoria (*Daucus carota* L.) mediante fermentación en estado sólido como una alternativa ecoeficiente. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 12, n. 1, 2018, p. 175-182.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7416>
- [6] CAICEDO, W.; FERREIRA, F.N.; VIÁFARA, DERWIN; GUAMAN, ANDREA; SOCOLA, CAROLINA; MOYANO, J.C. Composición química y digestibilidad fecal en cerdos del fruto de chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth) fermentado. *Livestock Research for Rural Development*, v. 31, n. 9, 2019, p. 140.

- [7] BORRAS, LUIS-MIGUEL; RODRÍGUEZ, CARLOS-EDUARDO; RODRÍGUEZ, ÁNGELA. Evaluation of calcium carbonate (CaCO_3) inclusion in solid-state kinetic fermentation of *Solanum tuberosum* postharvest waste. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, v. 11, n. 1, 2017, p. 143-150.
<http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.6145>
- [8] SAAVEDRA-MONTAÑEZ, GABRIEL-FERNANDO; CALA-GUERRERO, DEISY-CAROLINA; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO. Evaluación de subproductos agrícolas sometidos a fermentación en estado sólido. Bistua Revista De La Facultad De Ciencias Básicas, v. 16, n. 1, 2019, p. 13-27.
- [9] RODRÍGUEZ-SALGADO, ÁNGELA-MIREYA; BORRÁS-SANDOVAL, LUIS-MIGUEL; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO. Compositional quality of food obtained with solid state fermentation: potato and carrot. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, v. 13, n. 1, 2019, p. 8531-8531.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13i1.8531>
- [10] INCHAUSTI, DANIEL; TAGLE, EZEQUIEL, C. Bovinotecnia: Exterior y razas. Buenos Aires (Argentina): El Ateneo, 1982.
- [11] AGUIRRE, L.A.; RODRÍGUEZ, ZORAYA; BOUCOURT, R.; SACA, V.; SALAZAR, R.; JIMÉNEZ, M. Efecto del suero de leche en la fermentación en estado sólido de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) para uso en la alimentación de rumiantes. Cuban Journal of Agricultural Science, v. 52, n. 3, 2018, p. 303-312.
- [12] BREA-MAURE, ODELIN; ELÍAS-IGLESIAS, ARABEL; ORTIZ-MILÁN, ABEL; MOTTA-FERREIRA, WALTER; HECHAVARRÍA-RIVIAUX, SUSET. Efecto de la urea y del tiempo en la fermentación en estado sólido de la harina de frutos del árbol del pan (*Artocarpus altilis*). Ciencia y Agricultura, v. 12, n. 2, 2015, p. 91-101.
<https://doi.org/10.19053/01228420.4395>
- [13] CAICEDO, WILLAM; MOYA, CARLOS; TAPUY, ANDREA; CAICEDO, MARIA; PEREZ, MANUEL. Composición química y digestibilidad aparente de tubérculos de taro procesados por fermentación en estado sólido (FES) en cerdos de crecimiento. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, v. 30, n. 2, 2019, p. 580-589.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16078>
- [14] FONSECA-LÓPEZ, DANIA; MONROY-FONSECA, LILY; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO. Efecto del método de extracción del almidón de *Canna indica* L. sobre sus propiedades físico-químicas. Revista Lasallista de Investigación, v. 16, n. 2, 2019, p. 44-52.
<https://doi.org/10.22507/rli.v16n2a4>
- [15] YOHE, T.T.; SCHRAMM, H.; PARSONS, C.L.M.; TUCKER, H.L.M.; ENGER, B.D.; HARDY, N.R.; DANIELS, K.M. Form of calf diet and the rumen. I: Impact on growth and development. Journal of Dairy Science, v. 102, 2019, p. 8486-8501.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16449>
- [16] PAZOKI, A.; GHORBANI, G.R.; KARGAR, S.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A.; DRACKLEY, J.K.; GHAFARI, M.H. Growth performance, nutrient digestibility, ruminal fermentation, and rumen development of calves during transition from liquid to solid feed: Effects of physical form of starter feed and forage provision. Animal Feed Science and Technology, v. 234, 2017, p. 173-185.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.004>
- [17] ENGELKING, L.E.; MATSUBA, T.; INOUCHI, K.; SUGINO, T.; OBA, M. Effects of feeding hay and calf starter as a mixture or as separate components to Holstein calves on intake, growth, and blood metabolite and hormone concentrations. Journal of Dairy Science, v. 103, n. 5, 2020, p. 4423-4434.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17676>
- [18] BEIRANVAND, H.; GHORBANI, G.R.; KHORVASH, M.; NABIPOUR, A.; DEHGHAN-BANADAKY, M.; HOMAYOUNI, A.; KARGAR, S. Interactions of alfalfa hay and sodium propionate on dairy calf performance and rumen development. Journal of Dairy Science, v. 97, n. 4, 2014, p. 2270-2280.
<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6332>
- [19] CASTRO-FLORES, PAMELA; ELIZONDO-SALAZAR, JORGE-ALBERTO. Crecimiento y desarrollo ruminal en terneros alimentados con iniciador sometido a diferentes procesos. Agronomía Mesoamericana, v. 23, n. 2, 2012, p. 343-352.

- [20] KARGAR, S.; KANANI, M. Reconstituted versus dry alfalfa hay in starter feed diets of Holstein dairy calves: Effects on feed intake, feeding and chewing behavior, feed preference, and health criteria. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 5, 2019, p. 4061-4071.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15189>
- [21] IMANI, M.; MIRZAEI, M.; BAGHBANZADEH-NOBARI, B.; GHAFARI, M.H. Effects of forage provision to dairy calves on growth performance and rumen fermentation: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 2, 2017, p. 1136-1150.
- [22] MIRZAEI, M.; KHORVASH, M.; GHORBANI, G.R.; KAZEMI-BONCHENARI, M.; GHAFARI, M.H. Growth performance, feeding behavior, and selected blood metabolites of Holstein dairy calves fed restricted amounts of milk: No interactions between sources of finely ground grain and forage provision. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 2, 2017, p. 1086-1094.
- [23] OMIDI-MIRZAEI, H.; AZARFAR, A.; KIANI, A.; MIRZAEI, M.; GHAFARI, M.H. Interaction between the physical forms of starter and forage source on growth performance and blood metabolites of Holstein dairy calves. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 7, 2018, p. 6074-6084.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13892>
- [24] KHAN, M.A.; LEE, H.J.; LEE, W.S.; KIM, H.S.; KI, K.S.; HUR, T.Y.; CHOI, Y.J. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 7, 2007, p. 3376-3387.
<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0104>
- [25] BEIRANVAND, H.; KHANI, M.; OMIDIAN, S.; ARIANA, M.; REZVANI, R.; GHAFARI, M.H. Does adding water to dry calf starter improve performance during summer?. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 3, 2016, p. 1903-1911.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10004>
- [26] SUAREZ-MENA, F.X.; HEINRICHS, A.J.; JONES, C.M.; HILL, T.M.; QUIGLEY, J.D. Digestive development in neonatal dairy calves with either whole or ground oats in the calf starter. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 5, 2015, p. 3417-3431.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9193>
- [27] HARRIS, T.L.; LIANG, Y.; SHARON, K.P.; SELLERS, M.D.; YOON, I.; SCOTT, M.F.; BALLOU, M. A. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products, SmartCare in milk replacer and Original XPC in calf starter, on the performance and health of preweaned Holstein calves challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 9, 2017, p. 7154-7164.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12509>
- [28] REZAZADEH, FATEMEH; KOWSAR, RASOUL; RAFIEE, HASSAN; RIASI, AHMAD. Fermentation of soybean meal improves growth performance and immune response of abruptly weaned Holstein calves during cold weather. *Animal Feed Science and Technology*, v. 254, 2019, p. 114206.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114206>
- [29] MOJAHEDI, S.; KHORVASH, M.; GHORBANI, G.R.; GHASEMI, E.; MIRZAEI, M.; HASHEMZADEH-CIGARRI, F. Performance, nutritional behavior, and metabolic responses of calves supplemented with forage depend on starch fermentability. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 8, 2018, p. 7061-7072.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13798>
- [30] SILVA, A.L.; MARCONDES, M.I.; DETMANN, E.; MACHADO, F.S.; VALADARES-FILHO, S.C.; TRECE, A.S.; DIJKSTRA, J. Effects of raw milk and starter feed on intake and body composition of Holstein× Gyr male calves up to 64 days of age. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 4, 2015, p. 2641-2649.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8833>
- [31] JIANG, X.; MA, G.M.; CUI, Z.Q.; LI, Y.; ZHANG, Y.G. Effects of fermented corn gluten meal on growth performance, plasma metabolites, rumen fermentation and bacterial community of Holstein calves during the pre-weaning period. *Livestock Science*, v. 231, 2020, p. 103866.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103866>
- [32] KIM, M.H.; YUN, C.H.; LEE, C.H.; HA, J.K. The effects of fermented soybean meal on immunophysiological and stress-related parameters in Holstein calves after weaning. *Journal of dairy science*, v. 95, n. 9, 2012, p. 5203-5212.
<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5317>

- [33] HERNÁNDEZ-GARCÍA, JUAN-EMILIO; SEBASTIÁN-FRIZZO, LAUREANO; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, JUAN-CARLOS; VALDEZ-PANECA, GREGORY; VIRGINIA-ZBRUN, MARIA; CALERO-HERRERA, IBRAHIN. Evaluación in vitro del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Revista de Salud Animal*, v. 41, n. 1, 2019, p. e09 ref.52.
- [34] ALUGONGO, G.M.; XIAO, J.X.; CHUNG, Y.H.; DONG, S.Z.; LI, S.L.; YOON, I.; CAO, Z.J. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 2, 2017, p. 1189-1199.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11399>
- [35] KHAN, M.A.; CANSADO, D.M.; VON KEYSERLINGK, M.A.G. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. *Journal of dairy science*, v. 94, n. 7, 2011, p.3547-3553.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3871>
- [36] AVALOS-GONZÁLEZ, RAMIRO; PEÑA-REVUELTA, BLANCA-PATRICIA; RODRÍGUEZ-DIMAS, NORMA; ÁVILA-CISNEROS, RAFAEL; GONZÁLEZ-ÁVALOS, JOSÉ. Costos de alimentación en becerras Holstein suministrando leche entera adicionada con extracto de plantas medicinales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, v. 45, 2019, p. 339-354.

¿Cómo los consumidores valoran atributos de calidad de carne bovina y su disposición a pago?*

How consumers assess beef quality cues and the willingness to purchase?

Como os consumidores valorizam atributos de qualidade da carne bovina e sua disposição a pagar?

BARRAGÁN-HERNÁNDEZ, WILSON¹; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA²;
OLIVERA-ANGEL, MARTHA³; ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 23 de Abril 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Proyecto de investigación de origen: "Determinación de la calidad de carne bovina y la aceptación por parte del consumidor mediante el uso de pruebas con base en infrarrojo cercano". Financiación: Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias) en la convocatoria 727 de 2015, la estrategia de sostenibilidad de los grupos de investigación GRICA y Biogénesis de la Universidad de Antioquia y por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Culminación: 30 de junio de 2020.

- 1 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de investigación Turipaná. MSc, Estudiante de doctorado en Ciencias Animales. Cereté, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3528-4296>
- 2 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA). Dr. Agricultura y Medio Ambiente. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3377-8399>
- 3 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de investigación Biogénesis, Dr.Sci.Agr. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7853-4406>
- 4 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA). Dr. Ciencias Animales. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3352-8795>

Correspondencia: liliana.mahecha@udea.edu.co

RESUMEN

La percepción de calidad de carne es un concepto complejo y requiere de análisis multivariados para entender su estructura y conceptualización. El objetivo del estudio fue valorar la percepción de calidad de carne por parte del consumidor y la disponibilidad a pago por información de calidad. Se aplicaron 400 encuestas bajo un cuestionario estructurado. La encuesta indagó sobre el perfil socioeconómico del consumidor y la percepción sobre características intrínsecas y extrínsecas de la carne, perfil de consumo por información nutricional, estilo de vida, preferencias de cortes y frecuencia de compra, y disposición a pago por información nutricional, empleando una escala Likert. Los datos se analizaron mediante modelos de ecuaciones estructurales (SEM) y pruebas χ^2 . El SEM registró un ajuste satisfactorio (CFI=0,978, RMSEA=0,17). Los resultados indicaron que el consumidor conceptualiza ($P < 0,05$) la carne con base en aspectos intrínsecos (color, suavidad y pérdida de agua), extrínsecos (precio, bienestar animal y confianza) y la actitud de consumo saludable. El encuestado no consideró el concepto de calidad para la disposición a pago por información. Las mujeres, los consumidores entre 37-55 años y los empleados, registraron la puntuación más alta ($P < 0,05$) en el concepto de calidad de la carne.

ABSTRACT

Beef consumer's perception is complex and demands multivariate analyses to understand their structure and concept. This study aimed to evaluate beef consumer's perception and willingness to pay related to nutritional information. A total of 400 of structured surveys were applied. Surveyed were requested for information related to socioeconomic status and their perception about intrinsic and extrinsic beef cues, healthy consumption, nutritional information and willingness to pay, on a Likert scale. A structural equation model (SEM) and Chi-square were used to analyze. SEM showed a successful fit (CFI=0,978, RMSEA=0,17). The beef consumer's perception was conceptualized as intrinsic (color, tenderness, and water holding capacity), extrinsic (price, animal welfare, and trusted), and healthy consumption. Women, consumers between 37 and 55 years old, and employees were consumers with a better beef quality concept.

RESUMO

A percepção do consumidor de carne bovina é complexa e exige análises multivariadas para entender sua estrutura e conceito. Este estudo teve como objetivo avaliar a percepção e disposição dos consumidores de pagar por informações nutricionais. Foram aplicados 400 inquéritos estruturados. A pesquisa investigou o perfil relacionado ao status socioeconômico e sua percepção so-

PALABRAS CLAVES:

Características cárnicas;
Consumidores; Expectativas de consumo; Percepción de compra; Preferencias.

KEYWORDS:

Meat quality; Consumers;
Consumption expectations;
Purchase perception; Preference.

PALAVRAS-CHAVE:

Características da carne;
Consumidor; Expectativas de consumo; Percepção de compra, Preferencias.

Cómo citar este artículo: BARRAGÁN-HERNÁNDEZ, WILSON; MAHECHA-LEDESMA, LILIANA; OLIVERA-ANGEL, MARTHA; ANGULO-ARIZALA, JOAQUÍN. ¿Cómo los consumidores valoran atributos de calidad de carne bovina y su disposición a pago?. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 167-179. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)167-179](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)167-179)

bre as sinais intrínsecas e extrínsecas da carne bovina, consumo saudável, informações nutricionais e disposição para pagar, em escala Likert. Um modelo de equação estrutural (SEM) e qui-quadrado foram utilizados para o analise. O SEM mostrou um ajuste satisfatório (CFI = 0,978, RMSEA = 0,17). A percepção do consumidor de carne bovina foi conceituada como consumo intrínseco (cor, maciez e capacidade de retenção de água), extrínseco (preço, bem-estar animal e confiável) e na atitude de consumo saudável. Mulheres, consumidores entre 37 e 55 anos e funcionários, registraram a maior pontuação ($P < 0,05$) no conceito de qualidade da carne.

INTRODUCCIÓN

La calidad de la carne, percibida por el consumidor, se define como un concepto complejo [1], construido sobre la base de atributos intrínsecos y extrínsecos de la carne, experiencias previas y expectativas de consumo [2,3]. Los atributos intrínsecos, se han descrito como características inherentes a la carne, incapaces de ser modificadas sin alterar substancialmente la naturaleza del producto. Por su parte, los atributos extrínsecos están relacionados con el producto, pero no son inherentes a su naturaleza, como el precio, la marca, el sistema productivo entre otros [1,4]

Recientemente, varios investigadores se han preocupado por entender la percepción del consumidor de carne bovina [5,6] en conceptos tan generales como el producto mismo [7] específicos como la percepción de inocuidad [8], sostenibilidad [6], palatabilidad y marca comercial [9] o preferencia en contenido nutricional [10]. Este esfuerzo se relaciona con la necesidad de generar información que le permita a la industria de carne bovina, ofrecer un producto con mayor probabilidad de ser aceptado, con el objeto de enfrentar la disminución *per capita* del consumo de carne [5].

Ngapo *et al.* [11] han señalado que los consumidores pueden utilizar más de dos atributos de la carne para construir su concepto de calidad, entre ellos, los atributos intrínsecos como el color y el contenido de grasa, son importantes. Por su parte Flowers *et al.* [10], señalaron que el precio es el atributo de la carne que determina la elección del producto en consumidores americanos; sin embargo, obviando el precio, estos consumidores apuntan la experiencia de consumo y el grado USDA (United State Department of Agricultural) de la carne como los atributos más importantes.

El entendimiento de la percepción del consumidor se considera una herramienta necesaria para dinamizar la industria cárnica [12], toda vez que los atributos de la carne influyen en el concepto de calidad del producto, en la atención y frecuencia de elección que expresa el consumidor al momento de la compra y en la disponibilidad de pago por calidad [7,13,14]

En Colombia, el consumo *per capita* de carne bovina disminuyó de 20 kg.año⁻¹ en el año 2011, a 18,6 kg.año⁻¹ en 2019. Por su parte, sustitutos proteicos que compiten por su bajo costo como el pollo y el cerdo, aumentaron en 11,8 kg y 5,58 kg, al incrementar su consumo *per capita* de 23,8 kg.año⁻¹ a 35,6 kg.año⁻¹ y de 5,52 kg.año⁻¹ a 11,1 kg.año⁻¹, respectivamente. Asimismo, el pescado, considerado un sustituto proteico no tan económico, presentó un incremento de 4,2 kg (8,7 kg.año⁻¹ vs 4,52 kg.año⁻¹), en el mismo período [15]. Según Camacho *et al.* [16], las restricciones al consumo de carne en el consumidor colombiano, pueden estar asociadas a la percepción sobre potenciales problemas de salud derivados de su consumo.

Para el caso Colombiano, son escasas las investigaciones enfocadas a entender la percepción o caracterización del consumidor de carne bovina, pese a ser una de las demandas de la cadena cárnica [17]. FEDEGAN [18] desarrolló una investigación para caracterizar el consumidor de carne bovina con resultados que dan orientación sobre preferencias y características de la carne relacionadas con la calidad. Sin embargo, la percepción del consumidor no se puede entender con base en una sola característica, puesto que es un concepto complejo con factores interrelacionados, por lo cual, la aplicación de herramientas de análisis multivariado permitiría identificar los factores de la carne y sus interrelaciones que influyen en la percepción del consumidor. Por consiguiente, el objetivo fue determinar la percepción del consumidor sobre la calidad de carne bovina aplicando un modelo estructural y su relación con la disposición a pago por calidad.

MÉTODO

La encuesta se desarrolló para abordar los principales aspectos relacionados con la percepción de la calidad de la carne bovina. Las bases teóricas para el desarrollo de las preguntas fueron revisadas previamente por Henchion *et al.* [1], Grunert *et al.* [2], Font I Furnols *et al.* [3] y Frank *et al.* [19].

El formato para la captura de información abordó aspectos relacionados con el perfil socioeconómico del encuestado, frecuencias y restricciones en el consumo de carne bovina, percepción relacionada con características intrínsecas y extrínsecas del producto, aspectos orientados a investigar el perfil de consumo por información nutricional y estilo de vida, preferencias de cortes y frecuencia de compra, y disposición a pago por información nutricional, enfocada a perfil de ácidos grasos.

Las preguntas relacionadas con el perfil socioeconómico registraron los principales niveles en las categorías: género, rango salarial, nivel de estudios, ocupación y estado civil, así como también, la edad en años. Con relación a la percepción, el cuestionario aplicado (30 preguntas) empleó una escala tipo Likert de cinco puntos, donde el número 1 se relacionó con la percepción “Me disgusta extremadamente” y el 5 con “Me gusta extremadamente”. La disposición a pago y el valor en pesos colombianos (\$ COP) por información nutricional, se indagaron en una pregunta dicotómica (Sí, No) y en el valor monetario que el consumidor informó que estaba dispuesto a pagar sobre el precio medio de la carne que compraba, respectivamente. Las preguntas y el modelo estructural aplicado en esta investigación, fueron validados mediante encuestas vía email en 602 participantes, con una tasa de respuesta del 18% [20].

La investigación se llevó a cabo en octubre de 2019 en municipios del área Metropolitana de Antioquia (Colombia) en los 75°33'48,92" longitud Oeste y los 6°15'6.62" de latitud Norte, con una altitud media de 1.495 m.s.n.m. y temperatura promedio de 25°C. La muestra se estimó con base en los datos poblacionales informados por Mejía *et al.* [21], aplicando un muestreo poblacional estratificado por condición socioeconómica [14,22]. El cuestionario fue evaluado en un total de 400 consumidores de carne, asociados a una cadena comercial de supermercado y se aplicó en días no consecutivos, con el objeto de maximizar la representación de los consumidores [23]. Así mismo, se seleccionó el área de venta de carnes para la aplicación de la encuesta, con el objeto de garantizar que el encuestado fuera consumidor de este producto [14]. Cada encuestado fue indagado por su participación mediante un apartado de consentimiento informado en el formulario y su contribución fue compensada con un subproducto cárnico.

El modelo estructural propuesto consideró cuatro dimensiones exógenas (constructos formados a partir de variables observadas) relacionadas con la percepción de atributos intrínsecos de la carne, percepción extrínseca, actitud frente al consumo saludable y expectativa por información nutricional y una endógena (constructos formados a partir de variables latentes), asociada a la percepción de calidad de la carne. En cada uno de los constructos exógenos (cuadro 1), se validaron los criterios de adecuación muestral (MSA) de Kaiser-Meyer-Olkin validando la pertinencia de las variables con un valor > 0,5, y Alpha de Cronbach con índice > 0,6 [24], empleando la librería *psych* del software R-Project [25].

Cuadro 1. Validación de variables latentes exógenas e hipótesis en el modelo estructural.

Latente endógena	Latente exógena	Hipótesis	Alpha de Cronbach	MSA ¹
Percepción de calidad de carne	Percepción de atributos intrínseco	H1. Los consumidores valoran los atributos intrínsecos como parte del concepto de calidad	0,603	0,71
	Percepción de atributos extrínsecos	H2. Los consumidores valoran los atributos extrínsecos como parte del concepto de calidad	0,606	0,64
	Actitud frente al consumo saludable	H3. La actitud frente a un consumo saludable está relacionada con la percepción de calidad de carne	0,756	0,75
	Expectativa por información de calidad	H4. La expectativa de información nutricional en la carne forma parte del concepto de calidad	0,651	0,75

¹ Criterio de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin

El análisis de ecuaciones estructurales se realizó empleando la librería *lavaan* del software R-Project [26]. La fiabilidad del análisis se consideró con base en la ausencia de varianzas negativas en el error y cargas factoriales estandarizadas > 1. Así mismo, se evaluaron los criterios de bondad y ajuste relacionados con el cuadrado medio estandarizado del residual (SRMR por sus siglas en inglés) y el cuadrado medio del error por aproximación (RMSEA, por sus siglas en inglés), con un límite de aceptación < 0,08, y los índices de ajuste comparativo CFI (Comparative Fit Index) y TLI (Tucker-Lewis Index), con valores de aceptación > 0,9 [24,27]. Bajo el modelo seleccionado, se realizó la predicción de las variables latentes evaluadas, en la escala Likert de cinco puntos.

El contraste de las variables latentes generadas en el modelo estructural, con las variables de tipificación del consumidor, se realizó aplicando una prueba de Chi², rechazando la hipótesis de independencia con un valor alpha > 0,05.

RESULTADOS

El cuadro 2 presenta los resultados del perfil socioeconómico y demográfico de los consumidores encuestados. Los resultados sugieren que la participación de hombres y mujeres mostró una representación similar a la reportada en reciente censo para la población colombiana (48% mujeres y 51% hombres), al igual que la proporción de personas que se dedican a las actividades del hogar (19%) y de empleados (47%), pero diferente al porcentaje de estudiantes (18%) y de pensionados (3,6%) [28].

Cuadro 2. Características socioeconómicas y demográficas de los consumidores de carne (n=400).

Variable	Nivel	Porcentaje
Género	Masculino	41,32 %
	Femenino	58,67 %
Edad (Años)	< 37	31,78 %
	37 - 55	38,14 %
	55 - 74	28,11 %
	> 74	1,95 %
Ingresos (Número de SMLMV ¹)	No declara	16,38 %
	< 1	11,49 %
	1 - 2	41,07 %
	3 - 4	21,02 %
	5 - 6	7,33 %
	> 6	2,68 %
Estado civil	Casado(a)	43,27 %
	Separado(a)	6,35 %
	Soltero(a)	30,56 %
	Viudo(a)	3,66 %
	Unión libre	15,64 %
	Otro	0,4 %
Nivel educativo	Primaria	8,55 %
	Secundaria	35,94 %
	Tecnología	21,51 %
	Profesional	22,00 %
	Posgrado	11,00 %
	Otro	0,90 %
Ocupación	Servicio al hogar	19,55 %
	Desempleado	0,7 %
	Empleado	40,58 %
	Pensionado	11,49 %
	Estudiante	4,15 %
	Independiente	23,47 %

¹ salario mínimo legal mensual vigente

El SEM fue validado de acuerdo a Bagozzi and Yi [29] y se aceptó la hipótesis de igualdad entre las covarianzas calculadas y predichas ($X^2_{df381} P > 0,05$) con ajuste satisfactorio (CFI=0,978, TLI=0,973, RMSEA=0,17 y SRMR=0,48). La construcción de las variables latentes de orden exógenas y endógenas, se presentan en el cuadro 3.

Percepción intrínseca y extrínseca de la carne

Los consumidores valoran ($P < 0,05$) principalmente la calidad intrínseca de la carne a través de la percepción del color, el concepto de suavidad y la valoración de la pérdida de agua. Por el contrario, la conceptualización de la maduración de la carne no es considerada (CF = 0,10, $P > 0,05$).

Las características intrínsecas valoradas por los consumidores en el presente estudio, están en concordancia con los atributos intrínsecos de la carne informados por consumidores italianos [30], americanos [31] y mexicanos [11]. Entre estos atributos, el color de la carne y la pérdida de agua han sido informados como las primeras características que usa el consumidor para valorar la frescura del producto [1] y la terneza o suavidad, como uno de los factores más determinantes en la elección de la carne [32].

Con relación a la grasa como atributo intrínseco, la percepción sobre la influencia en la mejora de la calidad de la carne, aunque presentó un efecto significativo dentro de la conceptualización intrínseca, obtuvo una baja carga factorial (CF = 0,208, cuadro 3). Estos resultados son opuestos a lo informado por Henthorn *et al.* [1] y Font-i-Furnols and Guerrero [3], quienes señalan que la grasa visible es una de las señales de calidad de carne con mayor influencia en la percepción del consumidor. Así mismo, los resultados sobre la percepción de la grasa plantean la falta de conocimiento del consumidor encuestado sobre su efecto en la mejora de la experiencia de consumo [5], opuesto a lo reportado por Ngapo *et al.* [11], quienes demostraron que el consumidor mexicano, aunque presenta una percepción negativa de la grasa en la carne, reconoce que debe existir un mínimo de grasa para mejorar su sabor.

En el entorno colombiano, el concepto de maduración de la carne es poco conocido, como también fue demostrado por FEDEGAN [18] y Barragán *et al.* [20]. Sin embargo, está bien documentado el efecto positivo de los cambios bioquímicos y estructurales de la maduración en la palatabilidad (terneza, jugosidad y sabor) de la carne [33]. Por lo cual, los resultados del presente estudio permiten plantear la pobre educación en calidad de carne del consumidor colombiano, similar al caso del consumidor venezolano descrito por Arenas-De Moreno *et al.* [32], quienes indican que el concepto de maduración tiene mayor apropiación entre los consumidores de la región central de Venezuela (mayor preferencia y educación en calidad de carne) comparado con el consumidor de la región occidental.

En la percepción extrínseca, el concepto de bienestar animal, el sitio de compra de la carne y el precio, resaltan entre los atributos que más contribuyen a la formación del concepto ($P < 0,05$). Estos resultados concuerdan con Miranda de Lama *et al.* [34] quienes describieron la relación entre el bienestar animal y el consumidor de carne mexicano, y con Merlino *et al.* [30], que agruparon consumidores de carne ($n = 401$) en cinco grupos, el primero y más importante (32,5% de los consumidores), motivado por el precio de la carne y el cuarto (12,9%) caracterizados por la importancia en el bienestar animal.

El precio ha sido uno de los atributos de la carne de mayor impacto en la percepción del consumidor [2,7,10], sin embargo, a diferencia de reportes [10,30] en los cuales los consumidores priorizan el precio sobre otros atributos de la carne, resalta para este estudio la participación de la confianza del empaquetado como atributo de mayor carga factorial en la formación del concepto de calidad extrínseca.

La reorganización de importancia de los atributos en el concepto de calidad de carne fue informada por Merlino *et al.* [30], quienes indican que los consumidores modifican la jerarquía de los atributos que evalúan según el lugar donde compran la carne, lo cual pudo influenciar que los consumidores del presente estudio experimentaran una modificación de prioridades en los atributos extrínsecos, dado que el experimento fue desarrollado en el área de venta de carne de un supermercado.

Cuadro 3. Variables latentes y cargas factoriales en el modelo de ecuaciones estructurales para la percepción de la calidad de la carne bovina.

Latente	Variable observada	CF	Valor p
Percepción intrínseca	La suavidad de la carne es fundamental cuando voy a comprar	0,420	>0,001
	Si la carne escurre agua, no la compro	0,354	>0,001
	Reviso el color cuando compro la carne res	0,505	>0,001
	Prefiero carne con color rojo oscuro sobre un color rojo brillante	0,173	0,006
	Prefiero consumir carne fresca sobre carne madurada	0,102	0,096
	Considero que la grasa en la carne mejora su sabor	0,208	0,001
	Me gusta la carne de res sobre otras carnes	0,274	>0,001
	Confío más en comer carne de res que de pollo o cerdo	0,236	>0,001
	Confío más en comer carne de res que de pescado	0,183	0,004
	La forma de cocinar determina el tipo de carne que compro	0,267	>0,001
Percepción extrínseca	Quisiera comer más carne de res pero el precio me limita	0,169	>0,001
	La forma como está empacada la carne me genera confianza	0,501	0,015
	Conozco el proceso de beneficio y me interesa el bienestar animal	0,299	0,003
	Considero que la carne es costosa y por eso no como todos los días	0,422	0,016
	Usualmente compro la carne en el mismo sitio	0,227	0,038
	La información hacia el consumo de carne roja es negativa	-0,167	0,348
Expectativa hacia información nutricional	Reviso si el alimento contiene ácidos grasos omega y colesterol	0,647	>0,001
	Si la carne declarara el contenido de omega 3 o 6 me gustaría más	0,730	>0,001
	Si conociera cuánta proteína aporta la carne que como sería mejor	0,592	>0,001
	Límite mi consumo de res por lo que dicen sobre la grasa	0,350	>0,001
	Con relación a la grasa prefiero carne de res magra (poca grasa)	0,314	>0,001
Consumo saludable	Me preocupo por comer dietas saludables	0,517	>0,001
	Compro alimentos que sean lo más saludables para mí y mi familia	0,632	>0,001
	Cuando compro un alimento reviso su información nutricional	0,893	>0,001
	Me importa el contenido de grasa y proteína en los alimentos	0,727	>0,001
	Expectativa hacia información nutricional	0,684	>0,001
	Disposición a pago por información nutricional	0,461	>0,001
Percepción de la calidad de la carne bovina	Percepción intrínseca	0,892	>0,001
	Percepción extrínseca	0,752	0,017
	Consumo Saludable	0,711	>0,001
	Con relación a la grasa prefiero carne de res magra (poca grasa)	0,183	0,012
	El olor de la carne es importante a la hora de decidir su compra	0,537	>0,001
	Cuando compro un alimento reviso su información nutricional	-0,364	0,004
	Cuando compro carne me fijo en su contenido de grasa	0,355	>0,001
	Disposición a pago por información nutricional	-0,249	0,016
	La forma como está empacada la carne me genera confianza	0,511	0,002
	Considero que la carne de res es una buena fuente de nutrientes.	0,608	>0,001
	Expectativa hacia información nutricional	0,003	0,974

CF = Carga Factorial

Contrario los reportes de Enciso *et al.* [14], FEDEGAN [18] y Barragán *et al.* [20], quienes exploraron la valoración de aspectos de calidad de carne en consumidores colombianos, este estudio identificó que el concepto de bienestar animal formó parte de la conceptualización de la calidad extrínseca de la carne bovina. Estos resultados permitirían explorar la posibilidad de sellos y/o etiquetas que aporten valor agregado a la carne, basado en

experiencias previas que han demostrado que los consumidores podrían tener una disposición a pago por carne producida bajo esquemas de bienestar animal [34].

Actitud frente al consumo saludable y percepción sobre información nutricional

La expectativa de los consumidores asociada a la información nutricional de la carne, con enfoque en ácidos grasos estuvo conformada ($P < 0,05$) por la valoración positiva de conocer el contenido de ácidos grasos, la importancia de revisar la información nutricional asociada a los ácidos grasos y por la expectativa de apreciar más la carne si el consumidor conociera el contenido proteico. Así mismo, el constructo de expectativa por información, influyó positivamente ($P < 0,05$) la conceptualización de un hábito de consumo saludable, al igual ($P < 0,05$) que las variables observadas asociadas a la rutina de revisión de información nutricional en los alimentos y la importancia que el consumidor le da a los contenidos de grasa y proteína en los alimentos.

Lusk [35] afirmó que el 52,1% de los consumidores americanos ($n = 1.290$) basa su criterio de alimento saludable en un único componente nutricional del alimento, entre los cuales el contenido de grasa y proteína ocupan el tercer y noveno puesto en orden de importancia, respectivamente. Con relación a nuestros resultados, el entendimiento de la percepción de la grasa y/o de sus componentes es un aspecto importante, dado influencia negativa de la información asociada a la grasa y su efecto en la salud de los consumidores de carne [36]. Al respecto, Flowers *et al.* [31] reportaron que los consumidores de carne desconocen y confunden los conceptos asociados a grasa y perfil de ácidos grasos (monoinsaturado, polinsaturada y grasa *trans* de origen ruminal) y que la pedagogía sobre el beneficio de estos nutrientes, impacta positivamente la decisión de compra.

Concepto de calidad de carne bovina

La variable latente de construcción endógena asociada a la conceptualización de calidad de la carne se describe en cuadro 3. El SEM validó ($P < 0,05$) todas las hipótesis planteadas, con excepción ($P > 0,05$) de la asociada a la expectativa de la información. Adicionalmente, las variables observadas relacionadas con la preferencia por carne magra, el olor, revisión del contenido de grasa y contenido nutricional, disposición a pago por información de calidad, el empaque y la preferencia de la carne como alimento nutritivo, influyeron ($P < 0,05$) en la construcción de la percepción de calidad.

La percepción de los atributos intrínsecos y extrínsecos de la carne, y la actitud hacia un consumo saludable representaron los conceptos de mayor contribución positiva a la formación de la percepción de calidad ($CF > 0,70$). Por el contrario, la revisión del contenido nutricional ($CF = -0,36$) y la disposición a pago por información de calidad ($CF = -0,25$), contribuyeron negativamente a la percepción de calidad de la carne. Estos resultados sugieren que el consumidor de carne se preocupa por un consumo saludable y estaría dispuesto a pagar más por información de calidad nutricional en otros alimentos, pero su percepción y confianza en la carne bovina sobrepasa la necesidad de conocer la información nutricional y desincentiva el pago por esta información.

Al igual que en este estudio, varios autores han demostrado la importancia de las características intrínsecas y extrínsecas de la carne en el concepto de calidad de carne [1,11,32]. Sin embargo, contrario al registrado en este trabajo, la literatura reporta casos exitosos de disposición a pago por información nutricional en la carne bovina [10,31], influenciados por la necesidad creciente del consumidor por compra con base en decisiones informadas [35]. Adicionalmente, Barragán *et al.* [20] mediante la aplicación por formulario electrónico de la encuesta usada en el presente estudio, encontraron una disposición positiva al pago por información nutricional en la carne bovina, probablemente asociado al muestreo por conveniencia ($n = 108$) que influyó en una muestra con mayor proporción de encuestados con formación universitaria y con grado de maestría (82%) e ingresos económicos superiores a 5 SMLMV (38%).

Relación entre tipificación de consumidores y la percepción de calidad de carne

El análisis de dependencia entre las características del consumidor de carne y la predicción de la variable latente asociada a la percepción de la calidad de carne bovina identificada en el SEM, rechazó la hipótesis ($P < 0,05$) de independencia en las variables género, frecuencia en el consumo de carne y edad. Un mayor porcentaje de mujeres estuvo asociado a una puntuación más alta en la variable latente. Así como también, encuestados con una frecuencia de consumo de carne de >4 veces por semana y con edades entre los 37 y 55 años (cuadro 4).

La relación de dependencia entre las mujeres y la mayor calificación en la percepción de calidad de carne bovina pudo estar influenciada por factores asociados a los conceptos de alimentación saludable y percepción relacio-

Cuadro 4. Dependencia (X^2) entre el porcentaje de respuestas asociadas a la tipificación del consumidor de carne y la predicción de la variable latente percepción de la calidad de carne bovina.¹

		Predicción de variable latente ²			Valor de P
		2	3	4	
Género	Masculino	0,00	15,86	23,53	0,0440
	Femenino	0,26	17,65	42,71	
Ingresos (SMLMV) ³	No declara	0,26	7,42	9,46	0,2889
	< 1	0,00	4,86	6,14	
	1 – 2	0,00	13,04	28,39	
	3 – 4	0,00	7,93	12,79	
	5 – 6	0,00	1,79	5,12	
	> 6	0,00	1,28	1,53	
Nivel educativo	Primaria	0,00	2,30	6,65	0,0910
	Secundaria	0,26	14,07	21,48	
	Tecnología	0,00	6,39	14,83	
	Profesional	0,00	9,72	13,04	
	Posgrado	0,00	3,58	6,91	
	Otro	0,00	0,26	0,51	
Ocupación	Servicio al hogar	0,26	6,39	13,30	0,0860
	Desempleado	0,00	0,77	0,00	
	Empleado	0,00	16,11	25,32	
	Pensionado	0,00	2,81	8,18	
	Estudiante	0,00	2,56	1,28	
	Independiente	0,00	7,67	15,35	
Consumo de carne (número de veces por semana)	1-2	0,26	16,37	21,99	0,0290
	2-3	0,00	11,00	19,18	
	>4	0,00	8,95	22,25	
Restricción consumo	Si	0,26	7,93	9,46	0,6642
	No	0,00	28,39	53,96	
Edad (Años)	<25	0,00	7,16	4,60	0,0005
	25-37	0,00	8,70	11,76	
	37-55	0,26	9,72	27,62	
	55-74	0,00	9,97	18,16	
	>74	0,00	0,77	1,28	

¹ Números resaltados en negrita representan el mayor porcentaje de respuestas entre las dos variables analizadas.

² Predicción de la variable latente de acuerdo con el modelo SEM donde 1 se asocia a menor puntuación de la percepción y 5 a mayor puntuación.

³ Número de salario mínimo mensual legal vigente.

nada con el contenido de grasa como fue demostrado en el modelo SEM del presente estudio. Lusk [35], reportó que las mujeres poseen mayor afinidad por el concepto de alimento saludable comparado con los hombres, describiendo este concepto, entre otros aspectos, como alimentos bajos en grasa. De igual forma, Banović *et al.* [13] concluyó que las mujeres son capaces de decidir de forma más rápida la elección de la carne bovina con bajo contenido de grasa, comparado con los hombres. Según los anteriores autores, esta elección se basa en la conceptualización de que alimentos bajos en grasa son más saludables.

La relación entre la mejor conceptualización de la calidad de la carne bovina y los consumidores de mayor frecuencia de carne por semana, puede estar asociada a la preferencia y confianza en el consumo de carne. Estos resultados presentan similitud con los reportes de Flowers *et al.* [10] y Arenas-De Moreno *et al.* [32], quienes relacionan una mayor frecuencia de consumo con mayor preferencia por la carne.

Por último, se registró una mayor apropiación del concepto de calidad de carne entre consumidores de 37 y 55 años. Estos resultados podrían estar asociados a ser un rango de edad productiva y menor influencia del precio de la carne en su adquisición como se pudo observar en la tendencia ($P=0,0860$) de un mejor concepto de calidad de carne entre los consumidores con empleo. Realini *et al.* [37] identificó que los consumidores españoles de entre 41 y 60 años presentan mayor preferencia por la carne bovina comparado por consumidores jóvenes, quienes expresan restricción al consumo de carne por el precio y poseen menor preferencia por la carne por su estilo de vida.

CONCLUSIONES

La percepción de calidad de carne bovina de los consumidores encuestados se basó en la valoración de los factores intrínsecos y extrínsecos de la carne, en la actitud frente al consumo saludable y en variables relacionadas al producto, como el contenido de grasa y la preferencia de consumo, sin considerar importante la información nutricional. Estos resultados, aunque son válidos para el área de influencia del presente estudio, demuestran la adaptación de una metodología de evaluación de percepción del consumidor de carne bovina que puede ser aplicada en otras regiones de Colombia.

Conceptos reconocidos en el entorno científico que se asocian a mayor aceptación en la carne bovina, como es el caso de la maduración de la carne, no son valorados por el consumidor. Esta situación evidencia la necesidad de la industria de carne bovina de educar al consumidor sobre calidad de carne.

La percepción de calidad de carne bovina en los consumidores encuestados, no consideró la posibilidad de pagar más dinero por información de calidad. La confianza y la preferencia en la carne subvaloran la información nutricional. Así mismo, se identificó que los consumidores desconocen o no valoran el perfil de ácidos grasos y las implicaciones en la nutrición y salud. En general, el concepto de grasa se asocia a una percepción negativa, lo que hace necesario mayor educación sobre los componentes de la grasa y su efecto en la salud.

Aunque se identificó que el precio de la carne es un factor que condiciona la percepción del consumidor, el hallazgo de la valoración del bienestar animal como componente de la percepción extrínseca de la carne podría permitir el desarrollo de sellos de carne con énfasis en bienestar animal que aumenten la aceptación de la carne y posibiliten una mayor valoración económica del producto.

Las características del consumidor que más influyeron en el concepto de percepción de la calidad de carne bovina fueron: el género, la edad y la frecuencia de consumo. Esta tipología de consumidor estuvo asociada a conceptos de consumo saludable y contenido de grasa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Colombia por el apoyo brindado en la convocatoria de doctorado nacional 727 de 2015; así como también, a la estrategia de sostenibilidad de los grupos de investigación GRICA y Biogénesis de la Universidad de Antioquia, a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) y a la marca de carne "Quality Beef" de Euro Supermercados.

REFERENCIAS

- [1] HENCHION, M.; MCCARTHY, MARY; RESCONI, VIRGINIA C. Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives. *Meat Science*, v. 128, 2017, p. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.006>
- [2] GRUNERT, KLAUS G.; BRED AHL, LONE; BRUNSØ, KAREN. Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector - A review. *Meat Science*, v. 66, n. 2, 2004, p. 259–272.
[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00130-X)
- [3] FONTI-FURNOLS, MARIA; GUERRERO, LUIS. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science*, v. 98, n. 3, 2014, p. 361–371.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.025>
- [4] JOO, S.T.; KIM, G.D.; HWANG, Y.H.; RYU, Y.C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*, v. 95, n. 4, 2013, p. 828–836.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.044>
- [5] FRANK, D.; OYTAM, Y.; HUGHES, J. Sensory Perceptions and New Consumer Attitudes to Meat. In: *New Aspects of Meat Quality*. Tandil (Argentina): Elsevier, 2017. p. 667–698.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100593-4.00028-X>
- [6] DOS SANTOS, DAVID; ESTEVES-DE OLIVEIRA, TAMARA; GIANEZINI, MIGUEL ANJELO. Consumer's perception on beef sustainability in Porto Alegre, southern Brazil. *Business Management Dynamics*, v. 7, n. 02, 2013, p. 7–19.
- [7] ARDESHIRI, ALI; ROSE, JOHN-MATTHEW. How Australian consumers value intrinsic and extrinsic attributes of beef products. *Food Quality Preference*, v. 65, 2018, p. 146–163.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.10.018>
- [8] LIANA, MIMI; RADAM, ALIAS; YACOB, MOHD-RUSLI. Consumer perception towards meat safety: Confirmatory factor analysis. *International Journal of Economics Management*, v. 4, n. 2, 2010, p. 305–318.
- [9] VOEGELE, H.; RON, O.S.; GARMYN, A.J.; O'QUINN, T.G.; BROOKS, J.C.; MILLER, M.F. Consumer Perception of Beef Palatability Altered by Brand Recognition. *Meat Muscle Biology*, v. 1, n. 3, 2017, p. 8.
<https://doi.org/10.221751/rmc2017.008>
- [10] FLOWERS, SARAH; MCFADDEN, BRANDON R.; CARR, CHAD C.; MATEESCU, RALUCA G. Consumer preferences for beef with improved nutrient profile. *Journal of Animal Science*, v. 97, n. 12, 2019, p. 1–15.
<https://doi.org/10.1093/jas/skz327>
- [11] NGAPO, T.M.; BRAÑA-VARELA, D.; RUBIO-LOZANO, M.S. Mexican consumers at the point of meat purchase. *Beef choice*. *Meat Science*, v. 134, 2017, p. 34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.013>
- [12] TROY, D.J.; KERRY, J.P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science*, v. 86, n. 1, 2010, p. 214–226.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.009>
- [13] BANOVIC, MARIJA; CHRYSOCHOU, POLYMEROS; GRUNERT, KLAUS G.; ROSA, PEDRO J.; GAMITO, PEDRO. The effect of fat content on visual attention and choice of red meat and differences across gender. *Food Quality Preference*, v. 52, 2016, p. 42–51.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.03.017>

- [14] ENCISO, KAREN; BURKART, STEFAN; CHARRY, ANDRES; PUERTA-RODRIGUEZ, CRISTHIAN-DAVID; MUÑOZ, JHON-JAIRO; RUÍZ, ROCIO; GUTIERREZ, JHON-FREDDY; DÍAZ, MANUEL; VIVAS-QUILA, NELSON-JOSE; ALBAN-LOPEZ, NOÉ; MORALES-VELASCO, SANDRA; PETERS, MICHAEL. Consumer Preferences and Market Segmentation for Differentiated Beef with Less Environmental Impact. In Congress Solidarity in a competing world fair use of resources. Viena (Austria): Tropentag, 2016.
- [15] FEDERACIÓN COLOMBIANA DE GANADEROS (FEDEGAN). Ganadería Colombiana. Hoja de ruta 2018-2022. Bogotá (Colombia): Federación Colombiana de Ganaderos, 2018, 126 p.
- [16] SANTANA, A.; CAMACHO, C.; ESTÚVEZ, L.; GUTIÉRREZ, J.; GÓMEZ, M.; GARCÍA, G.; BALLESTEROS, CH.H. Competir e innovar la ruta de la industria bovina :agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena cárnica bovina en Colombia. Bogotá (Colombia): Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2009, p. 245.
- [17] GARCÍA, G.; RUÍZ, D. Plan Estratégico de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sector Agropecuario Colombiano. Cadena Cárnica Bovina. Bogotá (Colombia): Agrosavia, 2016, p. 48.
- [18] FEDERACIÓN COLOMBIANA DE GANADEROS (FEDEGAN). Así es nuestro consumidor. Bogotá (Colombia): Revista Carta Fedegan, 111, p.22-6.
- [19] FRANK, DAMIAN; SEON-TEA, JOO; WARNER, ROBYN. Consumer acceptability of intramuscular fat. Korean Journal Food Science Animal Resource, v. 36, n. 6, 2016, p.609-708.
<https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.699>
- [20] BARRAGÁN, WILSON; MAHECHA, LILIANA; ANGULO, JOAQUÍN; OLIVERA, MARTHA. Percepción de consumidores frente a información nutricional de la carne bovina. Idesia, v. 36, n. 4, 2018, p. 35-43.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292018005002302>
- [21] MEJÍA-ARANGO, L.J.; ESTRADA, C.M.; SALCEDO-AMAYA, G.J.; HIGUITA, J.M.; GRANADOS, J.D. Informe de calidad de vida Medellín 2016. In: Medellín Cómo vamos. Medellín (Colombia): 2016.
- [22] ALINDA, F.; KAVOI, M.; MIGISHA, J. Consumer willingness to pay for quality beef in Kampala, Uganda. Journal Agricultural Science Technology, v. 17, n. 2, 2017, p. 59-77.
- [23] XUE, HONG; MAINVILLE, DENISE; YOU, WEN; NAYGA, J.R.; RODOLFO, M. Consumer preferences and willingness to pay for grass-fed beef: Empirical evidence from in-store experiments. Food Quality Preference, v. 21, n. 7, 2010, p. 857-866.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.05.004>
- [24] HAIR, JOSHEP; BLACK, WILLIAM; BABIN, BARRY; ANDERSON, ROLPH. Multivariate Data Analysis. London (United Kingdom): Pearson, 2017, 734 p.
- [25] REVELLE, WILLIAM. psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. R package [online]. 2020. Disponible: <https://cran.r-project.org/web/packages/psych/psych.pdf> [citado 11 de marzo de 2020]
- [26] ROSSEEL, YVES. Lavaan: An R package for structural equation modeling and more. Version 0.5-12 (BETA). Journal Statistical Software, v. 48, n. 2, 2012, p. 1-36.
[10.18637/jss.v048.i02](https://doi.org/10.18637/jss.v048.i02)
- [27] BEAUJEAN, ALEXANDER A. Latent Variable Modeling Using R: A Step-by-Step Guide. New York (United State): Routledge, 2014, p. 1-205.
- [28] COLOMBIA. DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (DANE). Boletín Técnico. Censo nacional de población y vivienda (CNPV)-2018. [online]. 2019. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-nacional-de-poblacion-y-vivienda-2018> [citado 11 de marzo de 2020]
- [29] BAGOZZI, RICHARD P.; YOUJAE, YI. On the Evaluation of Structural Equation Models. Journal of Academy Marketing Science, v. 16, n. 1, 1988, p. 74-94.
<http://jam.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/009207038801600107>
- [30] MERLINO, V.M.; BORRA, D.; GIRGENTI, V.; DAL VECCHIO, A.; MASSAGLIA, S. Beef meat preferences of consumers from Northwest Italy: Analysis of choice attributes. Meat Science, v. 143, n. 2016, 2018, p.119-128.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.023>

-
- [31] FLOWERS, S.; MCFADDEN, B.; CARR, C.; MATEESCU, R. Understanding Beef Nutritional Attributes Contributes to Consumers' Willingness-to-Pay for a Healthier Product. *Meat Muscle Biololy*, v. 2, n. 2, 2018, p. 15–16.
- [32] ARENAS-DE MORENO, LILIANA; JEREZ-TIMAURE, NANCY; VALERIO-HERNÁNDEZ, JONTHAN; HUERTA-LEIDENZ, NELSON; RODAS-GONZÁLEZ, ARGENIS. Attitudinal Determinants of Beef Consumption in Venezuela: A Retrospective Survey. *Foods*, v. 9, n. 202, 2020, p.1–18.
<https://doi.org/10.3390/foods9020202>
- [33] KIM, Y.H.B.; MA, D.; SETYABRATA, D.; FAROUK, M.M.; LONERGAN, S.M.; HUFF-LONERGAN, E.; HUNT, M. CUnderstanding postmortem biochemical processes and post-harvest aging factors to develop novel smart-aging strategies. *Meat Science*, v. 144, 2018, p. 74–90.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.031>
- [34] MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; ESTÉVEZ-MORENO, L.X.; SEPULVEDA, W.S.; ESTRADA-CHAVERO, M.C.; RAYAS-AMOR, A.A.; VILLARROEL, M.; MARÍA, G.A. Mexican consumers' perceptions and attitudes towards farm animal welfare and willingness to pay for welfare friendly meat products. *Meat Science*, v. 125, 2016, p. 106-113.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.12.001>
- [35] LUSK, JAYSON L. Consumer beliefs about healthy foods and diets. *PLoS One*, v. 14, n. 10, 2019, p. 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223098>
- [36] SCOLLAN, NIGEL D.; PRICE, ELERI M.; MORGAN, SARAH A.; HUWS, SHARON A.; SHINGFIELD, KEVIN J. Can we improve the nutritional quality of meat?. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 76, n. 4, 2017, p. 603–618.
<https://doi.org/10.1017/S0029665117001112>
- [37] REALINI, C.E.; KALLAS, Z.; PÉREZ, JUAN M.; GÓMEZ, I.; OLLETA, J.L.; BERIAIN, M.J.; SAÑUDO, C. Relative importance of cues underlying Spanish consumers' beef choice and segmentation, and consumer liking of beef enriched with n-3 and CLA fatty acids. *Food Quality Preference*, v. 33, 2014, p. 74–85.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.11.007>

Extracto de taninos del fruto piñón de oreja (*Enterolobium cyclocarpum*) como curtiente para piel de conejo común (*Oryctolagus cuniculus*)*

Tannin extract from guanacaste tree fruit (*Enterolobium cyclocarpum*) as a tanning agent for European rabbit skin (*Oryctolagus cuniculus*)

Extrato de tanino da fruta da árvore guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) como um agente de bronzeamento para pele de coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*)

PAZ-DÍAZ, HÉCTOR-JULIO¹; AGUDELO-BELTRAN, ASTRID-YERITZA²;
PLATA-PASTOR, DAYANNA- ANGÉLICA³; PACHECO-VALDERRAMA, MÓNICA-MARÍA⁴;
SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA⁵; MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR⁶

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 8 de Mayo 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

- 1 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. Gerencia en seguridad, Riesgos Laborales y Salud en el trabajo. Barrancabermeja, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-7667>
- 2 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Ingeniera Agroindustrial. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7267-1183>
- 3 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Ingeniera Agroindustrial. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0330-9022>
- 4 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). M.Sc. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2051-4589>

RESUMEN

Los taninos son metabolitos secundarios producidos por el fruto piñón de oreja que pueden formar complejos con otras macromoléculas e incrementar la preservación de las pieles animales posterior al proceso de curtido. Este trabajo se enfocó en la extracción y cuantificación de taninos vegetales en el fruto piñón de oreja (*Enterolobium cyclocarpum*) para su potencial aplicación como curtiente en la piel de conejo raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). Para ello, se realizaron extracciones utilizando soluciones acuosas de etanol, metanol y acetona al 70% y se cuantificó por el método Folin Ciocalteu modificado utilizando ácido tánico como patrón. Se evaluó la capacidad de curtido en la piel de conejo mediante las propiedades físicas del cuero. Se encontró que la mayor concentración de equivalentes de ácido tánico (TAE) se obtuvo para la extracción con etanol al 70% (1,42 g TAE /L) y acetona al 70% (1,49 g TAE /L), respectivamente. Estos extractos fueron utilizados para obtener los cueros conforme las normas de estandarización para estos productos, superando solo 3 de 5 pruebas de estabilidad y resistencia bajo las normas oficiales. Estos extractos son un potencial sustituto de las sales de cromo, permitiendo procesos de curtido con menor impacto ambiental.

ABSTRACT

Tannins are secondary metabolites produced by guanacaste tree fruit that can form complexes with other macromolecules and increase the preservation of animal skins after the tanning process. This work focused on the extraction and quantification of vegetable tannins in guanacaste tree fruit (*Enterolobium cyclocarpum*) for its potential application as a tanning agent for European rabbit skin (*Oryctolagus cuniculus*). Extractions were performed using 70% aqueous ethanol, methanol and acetone solutions and then quantified by a modified Folin Ciocalteu method using tannic acid as the standard. Finally, the tanning capacity in rabbit skin was evaluated by the physical properties of the leather. It was found that the

PALABRAS CLAVE:

Cuero; Curtición; Antioxidantes; Preservantes; *Enterolobium cyclocarpum*; *Oryctolagus cuniculus*.

KEYWORDS:

Leather; Tanning; Antioxidants; Preservative; *Enterolobium cyclocarpum*; *Oryctolagus cuniculus*.

PALAVRAS-CHAVE:

Couro; Curtimento; Antioxidantes; Conservante; *Enterolobium cyclocarpum*; *Oryctolagus cuniculus*.

- 5 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). Esp. Aseguramiento de la Calidad e Inocuidad Agroalimentaria. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7592-2550>
- 6 Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial (GIADAI). M.Sc. Química. Barrancabermeja, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5139-0163>

Correspondencia: hector.paz@unipaz.edu.co

Cómo citar este artículo: PAZ-DÍAZ, HÉCTOR-JULIO; AGUDELO-BELTRÁN, ASTRID-YERITZA; PLATA-PASTOR, DAYANNA-ANGÉLICA; PACHECO-VALDERRAMA, MÓNICA MARÍA; SALAZAR-BELEÑO, ANA-MILENA; MURILLO-MÉNDEZ, CRISTIAN-JAHIR. Extracto de taninos del fruto piñón de oreja (*Enterolobium cyclocarpum*) como curtiente para piel de conejo común (*Oryctolagus cuniculus*). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 180-190. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)180-190](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)180-190)

highest concentration of tannic acid equivalents (TAE) was obtained for extraction with 70% ethanol (1,42 g TAE / L) and 70% acetone (1,49 g TAE/L), respectively. These extracts were used to obtain the leathers according to standards for these products, passing only 3 out of 5 stability and resistance tests under official standards. These extracts are a potential substitute for chromium salts, allowing tanning processes with less environmental impact.

RESUMO

Taninos são metabólitos secundários produzidos por fruta da árvore guanacaste que podem formar complexos com outras macromoléculas e aumentar a preservação de peles de animais após o processo de curtimento. Este trabalho teve como foco a extração e quantificação de taninos vegetais em frutos de árvore guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) para seu potencial aplicação como agente bronzeador para pele de coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*). As extrações foram realizadas em soluções aquosas de etanol 70%, metanol e acetona e quantificadas pelo método de Folin Ciocalteu modificado, utilizando ácido tânico como padrão. Por fim, a capacidade de curtimento da pele de coelho foi avaliada pelas propriedades físicas do couro. Verificou-se que a maior concentração de equivalentes de ácido tânico (TAE) foi obtida para a extração com etanol 70% (1,42 g TAE/L) e acetona 70% (1,49 g TAE/L), respectivamente. Esses extratos foram usados para obter os couros de acordo com as normas para esses produtos, passando em apenas 3 dos 5 testes de estabilidade e resistência de acordo com as normas oficiais. Esses extratos são potenciais substitutos dos sais de cromo, permitindo processos de curtimento com menor impacto ambiental.

INTRODUCCIÓN

La curtición es el proceso mediante el cual se convierten las pieles de los animales en cuero [1]. Se denomina curtiembre al proceso de someter las pieles de animales a una serie de tratamientos con diversas sustancias llamadas curtientes y otras diversas operaciones, destinadas a producir en ellas modificaciones químicas y físicas, con el fin de convertirlas en material duradero, casi imputrescible, apenas permeable al agua y a la vez, suave, elástico y flexible, es decir el cuero o la piel curtido [1,2].

Los métodos más destacados en el proceso de curtición son el curtido vegetal con sales de cromo hexavalente y con sales de alumbre utilizada en la industria de la peletería [3,4]. El curtido vegetal surgió por medio de la observación que puso en evidencia que, si una piel cruda entraba en contacto con la corteza, madera u hojas de ciertas plantas, aquella se manchaba y esas partes aparentemente dañadas, resultaban indemnes a la putrefacción [5,6]. A partir de 1960, comenzó el desarrollo de la industria del curtido vegetal basada en la utilización de taninos que eran producidos por una gran variedad de vegetales [7,8].

Debido a su naturaleza química, los taninos se convierten en una fuente natural de compuestos orgánicos, con la capacidad de curtir la piel [9]. Sin embargo, en épocas de la industria, el curtido con sales de cromo hexavalente empezó a tener una mayor relevancia [3]. En la actualidad, el curtido con cromo es una práctica comúnmente usada, no obstante, con un impacto negativo en el medio ambiente debido al alto grado de contaminación que genera en los afluentes [2,3].

Barrancabermeja se caracteriza por su clima tropical, con alto potencial de crecimiento y desarrollo de especies vegetales con gran contenido de taninos, como lo es el árbol *Enterolobium cyclocarpum*, conocido en Colombia como orejero o piñón de oreja, en el cual el fruto es una fuente potencial de taninos [10–12]. Los taninos son compuestos de polifenoles capaces de adherirse a las proteínas de colágeno de las pieles de los animales y realizar el proceso de curtido, otorgándoles características naturales como la flexibilidad y suavidad, principales características como curtiente vegetal en el proceso de transformación de la piel en cuero [7,13,14].

El conejo es un animal que constituye un potencial socio económico para el desarrollo de la región debido a su fácil crianza y su reproducción que es muy rápida por tener seis conejos en dos meses lo que equivale a 5 partos

al año, asegurando una oferta de su piel [15,16]. No necesita mayor área para su producción (10 metros cuadrados) en comparación con las especies de rumiantes (100 metros cuadrados en caso de los bovinos) [17].

Esta investigación se enfocó en el fruto piñón oreja para determinar la presencia de taninos en la semilla y vaina del fruto, y utilizarlos como curtiente en el proceso de curtido de la piel de conejo raza Nueva Zelanda y así minimizar el uso de cromo. El cuero de conejo, al ser procesado, puede sustituir las pieles exóticas que existen en el mercado.

MÉTODO

Localización

La investigación concerniente al proceso de extracción y cuantificación del tanino se desarrolló en el laboratorio de ciencias del Centro de Investigación Santa Lucía del Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), ubicado a 15 km de Barrancabermeja, Colombia. El proceso de curtición de la piel del conejo se realizó en la Unidad Académica Plantas Agroindustriales ubicado en el barrio Santa Bárbara en Barrancabermeja, Colombia. Condiciones ambientales, altura de 86 msnm, temperatura de 32°C y humedad relativa de 82%.

Materiales

Se utilizó el fruto del árbol piñón de oreja (*Enterlobium cyclocarpum*) y piel de conejo raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) como fuente de taninos vegetales y piel utilizada en el proceso de curtido, respectivamente. Cloruro férrico y carbonato de sodio grado analítico y superior fueron obtenidos de Merck. Se utilizó etanol, metanol, acetona grado reactivo como solventes de extracción de taninos vegetales. Se utilizó estándar de ácido tánico para la cuantificación de taninos. Para el proceso de curtición se utilizó ácido sulfúrico al 98%, ácido fórmico, formaldehído, sulfato de aluminio, bisulfito de sodio y bicarbonato de sodio; todos en grado reactivo o superior. Toda el agua utilizada fue ultrapura con una resistividad de 18 MΩ.

Pretratamiento

Se eligieron los frutos que se encontraron enteros, libre de defectos y de hongos visibles por la humedad y se realizó un lavado con agua destilada. Los frutos obtenidos y seleccionados se secaron en un horno a 103°C durante 24 horas hasta lograr un peso constante y una humedad del 10,43%. Luego, se realizó una molienda en un molino artesanal, debido a la dureza de la semilla, obteniendo una harina con un tamaño de partículas de aproximadamente 2 mm utilizando un tamiz de 10 mesh.

Extracción de taninos vegetales

Para la extracción de taninos vegetales presentes en la harina del fruto de piñón de oreja, se empleó la metodología descrita por algunos autores con algunas modificaciones [6,8,10,18–20]. Brevemente, se pesaron 30 g de la muestra y se disolvieron en 150 mL de solución extractora (etanol, metanol y acetona, todos en solución acuosa al 70%), se dejó la solución en agitación constante durante 15 min a 60°C, y luego se dejó en reposo. Las soluciones se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante de 4 días. Posterior a esto, se filtró al vacío con papel Whatman N°40. Por último, las soluciones se rotovaporaron para retirar todo el solvente posible y los extractos concentrados resultantes se almacenaron a 4°C.

Análisis cualitativo de taninos vegetales

Para determinar la presencia de taninos en los extractos obtenidos del fruto del piñón de oreja y determinar el tipo de taninos presentes, se adicionaron 2 gotas de solución de cloruro férrico al 5% en 1 mL de la muestra

extraída y se dejó reposar por 5 min. Luego, se aplicaron gotas de las muestras extraídas sobre un algodón y se tomó la imagen para ser analizada por ImageJ® [21].

Análisis cuantitativo de taninos vegetales

Los taninos presentes en los extractos obtenidos se cuantificaron siguiendo el procedimiento descrito por varios autores [8,10,13,18]. En resumen, se diluyeron los extractos 1:10 y se realizó la lectura directa de la absorbancia a 280 nm, usando agua destilada como blanco. Se construyó una curva de calibración usando ácido tánico como estándar. Finalmente, se determinó el contenido de taninos totales relacionando con la curva de calibración obtenida y se expresó como mg equivalentes de ácido tánico por g de muestra (mg TAE/mL de extracto).

Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como medias $\pm$ desviaciones estándar. Se aplicó análisis ANOVA y prueba de Tukey para la determinación de la significancia de los resultados. El análisis estadístico se realizó con el software TIBCO Statistica 13.5 Desktop Versión 1.35.

Proceso de curtición

Para preparar la piel a la curtición, se sumergieron las pieles en 3 L de solución de NaCl 2% para disolver algunas proteínas globulares y evitar el posterior hinchamiento. Luego, se enjuagaron con agua y se eliminó manualmente la grasa. Seguidamente, se agregaron las pieles en 3 L de agua y se adicionó 1 mL de H_2SO_4 al 10% (p/V) y se dejó durante 60 minutos para romper las fibras de colágeno y se adicionaron 10 mL de formaldehído al 13% (p/V) para fijar el pelo en la piel. Pasado el tiempo, las pieles se enjuagaron con abundante agua para eliminar el ácido y el formaldehído, y se eliminó la epidermis de la piel [15,16].

Para el curtido, las pieles se sumergieron en 3 L de solución de tanino (20 mL de extracto de tanino en 1 L de agua) durante 3 días, agitándose dos veces al día para una mayor fijación del tanino en la piel. La piel curtida es sometida a un baño de aceite de ricino con una solución de detergente neutro al 10% en agua tibia. El nutrido se hace masajeando la mezcla del aceite por el lado de la flor y del descarte hasta que sea absorbida totalmente. Por último, las pieles curtidas se dejan bajo la sombra para eliminar la humedad de la piel y dejar que el curtiente fije más en las fibras del colágeno.

Pruebas físicas

Se determinó la resistencia a la tracción, porcentaje de elongación y la resistencia al desgarre con un dinamómetro, donde se registró la fuerza máxima alcanzada hasta su rotura. Para la determinación de la distensión y resistencia de la capa de la flor en el ensayo de estallido con esfera se utilizó un rotómetro. Estos parámetros se utilizan para evaluar la capacidad del cuero para aguantar las tensiones multidireccionales a que se encuentra sometido en sus usos prácticos [7,16].

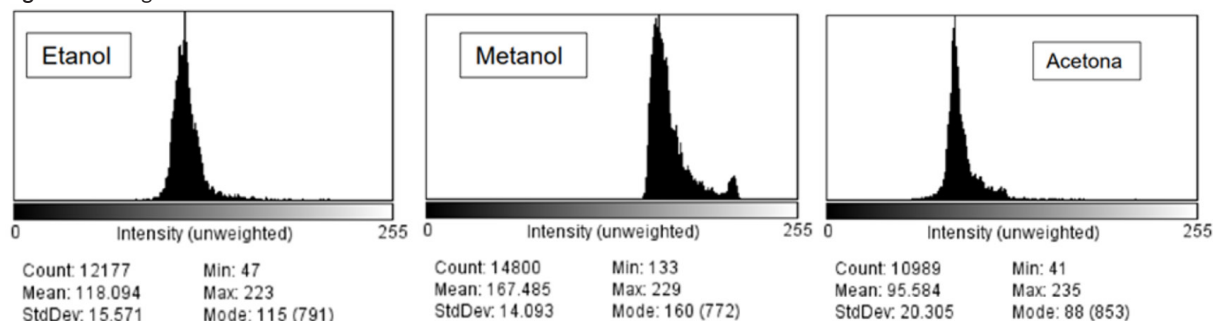
RESULTADOS

Análisis cualitativo de taninos

Se determinó la presencia de taninos en los extractos obtenidos a partir del fruto de piñón de oreja, donde se observó que las tres soluciones empleadas son ideales para la extracción de taninos, dando una coloración característica de la presencia de éstos. También, se realizaron estas pruebas cualitativas a través de todo el procedimiento de extracción para descartar errores metodológicos. Los extractos de estudio indicaron la reacción de color verde oscuro que sugiere la presencia de taninos condensados, así como lo indica Sánchez-García *et al.* [22].

Por medio de los extractos colorados, se obtuvo un histograma de color que sirve para identificar problemas en la exposición, el contraste o el rango dinámico de ésta. Cuando los valores de intensidad se acumulan en el extremo izquierdo del histograma, estamos ante una imagen infraexpuesta, mientras que si se acumulan en la parte derecha estamos ante una imagen sobreexpuesta [21]. Con referencia a lo anterior, en la figura 1 se observa que la solución de etanol tiene un amplio rango dinámico en comparación con la acetona y el metanol, quienes de-

Figura 1. Histograma de color de los extractos obtenidos con las tres soluciones utilizadas.



notan errores al estar sus valores acumulados en la parte izquierda y derecha, respectivamente, lo que permite que el etanol posea una mayor capacidad para extraer los taninos de la matriz vegetal.

Según diversos autores, el rango de temperatura ideal durante el método de extracción debe ser entre 50 y 60°C puesto que a temperaturas mayores, los taninos tienden a degradarse [5,6,10]. Debido a esto, la temperatura ideal durante el proceso de extracción fue de 60°C para garantizar un mayor rendimiento de extracción en el proceso y evitar la degradación de los compuestos que son de importancia para la investigación.

Cuantificación de taninos

Cuadro 1. Cuantificación de ácido tánico en extractos del fruto de piñón de oreja utilizando varios solventes de extracción.

Solvente	Concentración de taninos, g TAE/ L de extracto	Rendimiento de extracción, %
Etanol	1,42 ± 0,05 ^a	78
Acetona	1,49 ± 0,07 ^a	80
Metanol	1,32 ± 0,01 ^b	71

^{a,b} Cada letra corresponde a datos que no poseen diferencias significativas.

Se determinó el contenido de taninos totales en los extractos concentrados obtenidos del fruto de piñón de oreja utilizando los tres solventes (todos los solventes utilizados para la extracción de taninos están en solución acuosa al 70%). Los resultados se pueden observar en el cuadro 1.

Los resultados de cuantificación de compuestos fenólicos expresados en ácido tánico permiten observar que la mayor concentración lo arrojó la acetona al 70% con 1,49 g TAE/L y seguido por el etanol con 1,42 g TAE/L. El metanol dio un valor bajo con un 1,322 g TAE/L, demostrando que las soluciones de acetona y de etanol extraen una gran variedad de compuestos fenólicos que son más solubles en estas mezclas y poseen mayores valores de rendimiento de extracción.

Hay pocos estudios sobre la cuantificación de taninos en estas matrices y similares, uno de ellos es el trabajo de Aguilar-López *et al.* [10] donde el rendimiento de extracción de taninos fue menor del 10% debido a las condiciones agresivas de extracción, como altas temperaturas y largos tiempos de extracción. Otros autores utilizaron etanol como solución para extracción de taninos, obteniendo rendimientos menores que 30%.

En los resultados expresados, no hay diferencias significativas entre la concentración de taninos en el extracto utilizando acetona y etanol. Para la elección del solvente, se tuvo en cuenta el aspecto económico, así como la reactividad con el medio, facilidad de manejo, entre otros. Como consecuencia a esto, se eligió los extractos con etanol al 70% para los procesos de curtición teniendo en cuenta las características señaladas, también por ser un reactivo GRAS.

Determinación de la resistencia a la tracción y porcentaje de elongación

Se determinaron los valores de resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación a las pieles de conejo curtidas con extractos líquidos de taninos vegetales y se registraron en el cuadro 2. Según los resultados de

Cuadro 2. Resultados de resistencia a la tracción y porcentaje de elongación.

Sentido del corte	Tracción, MPa	Elongación a carga determinada de 50 N, %	Elongación a la rotura, %
Paralelo	20,2 ± 5,1	0,9 ± 0,1	4,8 ± 2,6
Perpendicular	25,1 ± 5,1	1,4 ± 0,2	4,3 ± 1,6

resistencia a la tracción, se afirma que las pieles de conejo curtidas con el extracto de taninos del fruto piñón de oreja, cumplen con la norma técnica internacional de resistencia a la tensión (ISO 3376:2011), cuyo valor mínimo permisible es de 150 kf/cm² (20,2 MPa), para considerarse cueros de buena calidad. Por su parte, el porcentaje de elongación reporta un 4,8% a una carga de 50 N según lo establecido por la norma.

Sin embargo, estos resultados expresan que las pieles curtidas con los extractos de taninos vegetales no son adecuadas para usar en marroquinería y calzado según la elasticidad que debe tener un cuero. Por lo tanto, no cumplen con los valores de calidad de la norma técnica internacional (ISO 3376:2011); que manifiesta, como parámetro de calidad, valores entre 40 y 80%.

Valores de elongación por debajo del intervalo indican un cuero con muy poca grasa tornándose firme y quebradizo, que dificulta su manipulación al momento de la confección. Esto puede indicar que el manejo final de este tipo de cuero puede decantarse a un manejo suave, como a la marroquinería artesanal.

Determinación de la resistencia al desgarre

En el cuadro 3 se presentan los resultados de la resistencia al desgarre de los cueros de piel de conejo curtidos con los extractos de taninos del fruto piñón de oreja. Estos resultados se expresaron en dos sentidos: longi-

Cuadro 3. Resultados de determinación de la resistencia al desgarre.

Sentido del corte	Espesor, mm	Desgarre, N
Paralelo	0,67	5,8 ± 3,3
Perpendicular	0,65	22,5 ± 3,3

tudinal (paralelo al espinazo) y transversal (perpendicular al espinazo) del cuero de conejo curtido con tanino vegetal para un promedio de 14,1 N. En la norma técnica (NTP ISO 3377:1 2002) menciona que la resistencia al desgarro debe ser mínimo de 30 N, por lo tanto, el cuero de conejo curtido con extractos de tanino vegetal no cumple con los requerimientos mínimos de la norma estipulada.

Sin embargo, los valores de resistencia al desgarre indican que el cuero obtenido puede utilizarse para artículos de marroquinería simple y decoración, debido a que no requieren altas tensiones o resistencias a condiciones climáticas adversas.

Determinación de la distensión y resistencia de la capa de la flor

Cuadro 4. Resultados de determinación de distensión.

Lámina	Inicial		Final	
	Rotura, daN	Distensión, mm	Rotura total, daN	Distensión, mm
1	15,6	5,9	20,3	7,9
2	19,5	5,8	23,8	8,7
3	21,6	4,6	31,3	6,3
Promedio	18,9	5,4	25,1	7,6

En el cuadro 4 se presentan los resultados de la distensión y resistencia de la capa de flor de los cueros de piel de conejo curtidos con los extractos de taninos del fruto piñón de oreja, donde se reportó como resultado para este análisis de distensión un promedio de 7,63 mm.

Comparando los resultados de la presente investigación con las exigencias de calidad para el cuero con la norma técnica internacional (ISO 3377-2:2016) infiere como mínimo permisible 7,5 mm para considerarse como cueros muy resistentes a la fricción. Se observó que, según los resultados expuestos, las láminas de cuero de conejo curtidas con taninos vegetales cumplen con esta exigencia.

Estos argumentos pueden reforzar la opción de utilización de estos cueros para la industria de marroquinería, donde no se implementan altas tensiones al desgarre, pero puede mantener propiedades como textura y rigidez adecuada en estos productos.

En las pruebas con resultados no favorables hubo fallas en el proceso del aceitado, debido a que en esta fase se le otorga propiedad de resistencia al desgarre. Esto puede verse afectado en el producto final que se quiere obtener con este tipo de cuero, que puede decantarse a una utilización de marroquinería o al mejorar el proceso de aceitado, puede utilizarse en calzado y talabartería.

Temperatura de contracción del cuero

Se determinó el valor de temperatura de contracción del cuero de piel de conejo curtida con extractos de tanino vegetal del piñón de oreja. El valor promedio reportado de esta característica es de 101°C, según lo cual las pieles soportan temperaturas mayores de contracción regresando fácilmente a su estado inicial. Los resultados de temperatura de contracción en la presente investigación superaron a los estudios realizados por Hidalgo-Almeida y Siguencia-Yupa [23,24]. Ellos indican que la ISO 3380:2015 establece como mínimo permisible los 75°C, que debería soportar antes de producirse una contracción total y que pueda revertirse a su estado normal sin pérdida de superficie. En efecto, el producto curtiente ha ingresado en el tejido interfibrilar para soportar la temperatura a la cual se produce un encogimiento perceptible.

CONCLUSIONES

Se logró la extracción de los taninos vegetales del piñón de oreja (*Enterlobium cyclocarpum*) con resultados cualitativos que reportaron la presencia de taninos condensados en los extractos. Para las extracciones realizadas

con los diferentes solventes y la cuantificación de taninos, la acetona y el etanol otorgan los mayores resultados. Se eligió el extracto de etanol para la curtición de las pieles, debido a la economía, a la compatibilidad con los principios de química verde y facilidad de manejo.

Se determinaron los parámetros físico-mecánicos para la piel de conejo raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) curtida con extractos etanólicos de taninos vegetales provenientes del fruto de piñón de oreja. Estos resultados definen el estado del cuero obteniéndose tres parámetros favorables (resistencia a la tracción, determinación de la distensión y temperatura de encogimiento) y dos no tan favorables (determinación del porcentaje de elongación y resistencia al desgarre) de acuerdo con las normas internacionales señaladas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Universitario de La Paz – Unipaz y al Laboratorio de Pruebas de Calzado y Polímeros Avanzados LACPA de Centro de Diseño y Manufactura del Cuero por su colaboración en esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] SATHISH, MURALI; MADHAN, BALARAM; JANARDHANAN-SREERAM, KALARICAL; RAGHAVA-RAO, JONNALAGADDA; UNNI-NAIR, BALACHANDRAN. Alternative carrier medium for sustainable leather manufacturing – a review and perspective. *Journal of Cleaner Production*, v. 112, 2016, p. 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.118>
- [2] WANG, LI; JUN, LI; YAN, JIN; MING, CHEN; JIANHONG, LUO; XINHUA, ZHU; YUQIANG, ZHANG. Study on the removal of chromium (III) from leather waste by a two-step method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 79, 2019 p. 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.06.030>
- [3] FONTAINE, MATHILDE; CLEMENT, YOHANN; BLANC, NICOLÁS; DEMESMAY, CLAIRE. Hexavalent chromium release from leather over time natural ageing vs accelerated ageing according to a multivariate approach. *Journal of Hazardous Materials*, v. 368, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.112>
- [4] ZHANG, JINWEI; HAN, ZHANGWEI; TENG, BO; CHEN, WUYONG. Biodeterioration process of chromium tanned leather with *Penicillium* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 116, 2017, p. 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.019>
- [5] SHIRMOHAMMADLI, YOUNES; EFHAMISISI, DAVOOD; PIZZI, ANTONIO. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops and Products*, v. 126, 2018, p. 316–332. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.034>
- [6] SOBEH, MANSOUR; MAHMOUD, MONA F.; ABDEL FATTAH, MOHAMED A.O.; EL-BESHBISHY, HESHAM A.; EL-SHAZLY, ASSEM M.; WINK, MICHAEL. Hepatoprotective and hypoglycemic effects of a tannin rich extract from *Ximenia americana* var. *caffra* root. *Phytomedicine*, v. 33, 2017, p.36–42. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.003>
- [7] ROMERO-DONDIZ, ESTELA-MARÍA; ALMAZÁN, JORGE-EMILIO; RAJAL, VERONICA-BEATRIZ; CASTRO-VIDAURRE, ELZA-FANI. Removal of vegetable tannins to recover water in the leather industry by ultrafiltration polymeric membranes. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 93, 2015, p.727–735. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.06.022>
- [8] DE HOYOS-MARTÍNEZ, PEDRO L.; MERLE, JULIETTE; LABIDI, JALEL; CHARRIER-EL BOUHTOURY, FATIMA. Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, v. 206, 2019, p. 1138–1155. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.243>

- [9] SEBESTYÉN, Z.; JAKAB, E.; BADEA, E.; BARTA-RAJNAI, E.; ŞENDREA, C.; CZÉGÉNY, Z. Thermal degradation study of vegetable tannins and vegetable tanned leathers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 138, 2019, p. 178–187.
<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.12.022>
- [10] AGUILAR-LÓPEZ, JORGE; JAÉN-JIMÉNEZ, JEAN-CARLO; VARGAS-ABARCA, ANA-SOFÍA; JIMÉNEZ-BONILLA, PABLO; VEGA-GUZMÁN, ILEANA; HERRERA-NÚÑEZ; JACQUELINE; BORBÓN-ALPÍZAR, HENRY; SOTO-FALLAS, ROY MARIO. Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de once especies maderables de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, v. 25, n. 4, 2012, p. 15–22.
<https://doi.org/10.18845/tm.v25i>
- [11] THOMAS, E.; TOBÓN, C.G.; GUTIÉRREZ, J.P.; CAICEDO, C.A.; HIGUITA, L.M.; BECERRA, L.A.; GONZÁLEZ, M. A Genetic diversity of *Enterolobium cyclocarpum* in Colombian seasonally dry tropical forest: implications for conservation and restoration. *Biodiversity and Conservation*, v. 26, n. 4, 2017, p. 825–842.
<https://doi.org/10.1007/s10531-016-1274-8>
- [12] MOLINA-BOTERO, ISABEL-CRISTINA; ARROYAVE-JARAMILLO, JULIÁN; VALENCIA-SALAZAR, SARA; BARAHONA-ROSALES, ROLANDO; AGUILAR-PÉREZ, CARLOS- FERNANDO; AYALA- BURGOS, ARMÍN; ARANGO, JACOBO; KU-VERA, JUAN- CARLOS. Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Animal Feed Science and Technology*, v. 251, 2019, p. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.011>
- [13] PINTO-TRINIDAD, LUIS-RENÉ; RAMÍREZ-DÍAZ, ROSELIA; SANDOVAL-GONZÁLEZ, LAURA-MARI-CRUZ. Efecto del uso de semillas arbóreas forrajeras sobre la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 17, n. 2, 2019, p. 46–52.
<http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v17n2.1252>
- [14] KASAY, M.I.; HUAMÁN, J.; GUERRERO, M. Estudio cualitativo y cuantitativo de Taninos de la *Oenothera Rosea* L'Hér. Ex Aiton. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, v. 16, n. 1, 2013, p. 13–19.
- [15] SOUSA, MLR.; HOCH, AL.; GASPARINO, E.; SCAPINELLO, C.; DOURADO, DM.; DA SILVA, SC.; LALA, B. Compositional analysis and physicochemical and mechanical testing of tanned rabbit skins. *World Rabbit Science*, v. 24, n. 3, 2016, p. 233–238.
<https://doi.org/10.4995/wrs.2016.4037>
- [16] PANCAPALAGA, WEHANDAKA; NITIHARJO, SUYATNO. The quality of rabbit hide tanned by mangrove (*Rhizophora mucronata*). *Leather and Footwear Journal*, v. 19, n. 4, 2019, p. 189–194.
<https://doi.org/10.24264/lfj.19.4.3>
- [17] TAHA, E.A.; SAMIA, A.H.; NASR, A.I. Evaluating skin quality of some rabbit breeds under Egyptian conditions. *World Rabbit Science*, v. 25, n. 2, 2017, p. 193–200.
<https://doi.org/10.4995/wrs.2017.6652>
- [18] GALINDO, JUANA; GONZÁLEZ, NIURCA; MARRERO, YOANDRA; AREADNE, SOSA; RUIZ, T.; FEBLES, G.; VERENA-TORRES, ANA I.; ACHANG, G.; MOREIRA; ONIDIA; SARDUY, LUCÍA; NODA, AIDA C. Efecto del follaje de plantas tropicales en el control de la producción de metano y la población de protozoos ruminales in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, v. 48, n. 4, 2014, p. 359–364.
- [19] RHAZI, NAIMA; HANNACHE, H.; OUMAM, M.; SESBOU, A.; CHARRIER, B.; PIZZI, A. Charrier-El Bouhtoury, F. Green extraction process of tannins obtained from Moroccan *Acacia mollissima* barks by microwave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 8, 2019, p. 2668–2684.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.04.032>
- [20] SEABRA, INES J.; CHIM, RITA B.; SALGUEIRO, PABLO; BRAGA, MARIA; DE SOUSA, HERMINÍO C. Influence of solvent additives on the aqueous extraction of tannins from pine bark: potential extracts for leather tanning: Potential pine bark extracts for leather tanning/retanning processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 93, n. 4, 2018, p. 1169–1182.
<https://doi.org/10.1002/jctb.5478>

- [21] CAMPA-FERNÁNDEZ, VICTOR M. Análisis de imágenes de microscopía con ImageJ. 1 ed. Madrid (España): Create- Space publishing, 2017, 128 p.
- [22] SÁNCHEZ-GARCÍA, YARIMA; RONDÓN-ARIAS, LEYSDI; HERMOSILLA-ESPINOSA, ROBINSON; ALMEIDA-SAAVEDRA, MANUEL. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallos y flores de la *Helychrysum bracteatum*. Química Viva, v. 9, n. 1, 2010, p. 40–45.
- [23] HIDALGO-ALMEIDA, LUIS-EDUARDO. Comparación de la curtición con harina de *Caesalpinia Spinosa*, con una curtición mineral con sulfato de cromo para pieles caprinas. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial, v. 19, n. 1, 2016, p. 100–108.
<https://doi.org/10.15381/idata.v19i1.12542>
- [24] SIGUENCIA-YUPA, EVELYN-PAOLA. Curtición de pieles ovinas con la utilización de un tanino catiónico castanea sativa y tres niveles de cromo (3, 4 y 5 %) [Tesis de pregrado para Ingeniería en Industrias Pecuarias]. Riobamba (Ecuador): Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2018, 98 p.

Efecto crioprotector de la yema de huevo en semen de *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae)*

Cryoprotective effect of egg yolk in semen of *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae)

Efeito cioprotetor do iêm de ovo no sêmen de *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae)

DUARTE-TRUJILLO, ASTRID-STEFANÍA¹; ARDILA-ARTUNDUAGA, MICHELLE-BRIGITTE²;
GUAJE-RAMÍREZ, DIANA NATHALIE³; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR MAURICIO⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 14 de Julio 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Título del proyecto de origen: "Evaluación de protocolos de crioconservación seminal en especies ícticas nativas como línea base para la conformación de un banco de semen de peces nativos con fines comerciales y de conservación". Financiación: Gobernación del Meta; Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación; Universidad de los Llanos. Culminación: agosto de 2020.

- 1 Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (FCARN), Instituto de Acuicultura de los Llanos, Grupo de Investigación Sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (GRITOX). Ingeniero Agroindustrial. Villavicencio, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1777-374X>
- 2 Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (FCARN), Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Estudiante. Villavicencio, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0013-0003>
- 3 Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (FCARN), Instituto de Acuicultura de los Llanos, Grupo de Investigación Sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (GRITOX). Médico Veterinario y Zootecnista. Villavicencio, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6519-6372>
- 4 Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (FCARN), Instituto de Acuicultura de los Llanos, Grupo de Investigación Sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (GRITOX). Dr. (c) en Ciencias Agrarias. Villavicencio, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-4871-2715>

RESUMEN

Prochilodus mariae es una especie endémica del río Orinoco, de gran importancia ecológica, cultural y económica, cuyo protocolo de criopreservación seminal aún no ha sido establecido. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso y la exclusión de la yema de huevo en el diluyente de criopreservación, sobre la calidad seminal de *P. mariae*. Para ello, el semen fresco de cinco machos sanos y sexualmente maduros fue diluido (1:6), empacado en pajillas (0,5 mL), congelado y almacenado en nitrógeno líquido. Se emplearon dos tratamientos: diluyente con yema de huevo (YH) y sin yema de huevo (SYH). Se evaluó motilidad, duración de la motilidad, morfología, integridad de membrana plasmática y fertilidad del semen descongelado, usando como control semen fresco. Los datos fueron tratados con estadística descriptiva y paramétrica, con un nivel de confianza del 95%. Los resultados demostraron que la exclusión de la yema de huevo mejoró significativamente la motilidad y la duración de la motilidad, aunque no presentó una influencia estadísticamente significativa sobre la integridad de membrana plasmática, la anormalidad morfológica y la fertilidad. La adición de la yema de huevo al diluyente de criopreservación no presentó el efecto crioprotector esperado, siendo necesario evaluar diferentes concentraciones e interacciones con otros componentes del diluyente.

ABSTRACT

Prochilodus mariae is an endemic species from Orinoco River, of great ecological, cultural and economic importance, whose seminal cryopreservation protocol has not yet been established. The aim of this work was to evaluate the effect of use and exclusion of egg yolk in the cryopreservation diluent, on the seminal quality of *P. mariae*. Thus, fresh semen of five healthy and sexually mature males was diluted (1:6), packed in 0,5 mL straws, frozen and stored in liquid nitrogen. Two treatments were used: diluent with egg yolk (YH) and diluent without egg yolk (SYH). Motility, motility duration, morphology, plasma membrane integrity and fertility of thawed semen were evaluated, using fresh semen as control. The data were treated with descriptive and parametric statistics, with a confidence level of 95%. The results showed that exclusion of egg yolk significantly improved motility and motility duration, although it did not have a statistically significant influence on plasma membrane integrity, morphological abnormality and fertility. The addition of the egg yolk to the cryopreservation diluent did not present the expected cryoprotective effect. It's necessary to evaluate different concentrations of egg yolk and its interactions with other components of the diluent.

Correspondencia: vmmedinarobles@unillanos.edu.co

Cómo citar este artículo: DUARTE-TRUJILLO, ASTRID-STEFANÍA; ARDILA-ARTUNDUAGA, MICHELLE-BRIGITTE; GUAJE-RAMÍREZ, DIANA-NATHALIE; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR-MAURICIO. Efecto crioprotector de la yema de huevo en semen de *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 191-205. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)191-205](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)191-205)

PALABRAS CLAVE:

Bocachico; Calidad seminal; Criopreservación; Espermatozoide; Characiformes; Prochilodontidae.

KEYWORDS:

Bocachico fish; Seminal quality; Cryopreservation; Spermatozoa; Characiformes; Prochilodontidae.

PALAVRAS-CHAVE:

Coporo; Qualidade seminal; Criopreservação; Espermatozóide; Characiformes; Prochilodontidae.

RESUMO

Prochilodus mariae é uma espécie endêmica do rio Orinoco, de grande importância ecológica, cultural e econômica, cujo protocolo de criopreservação seminal ainda não foi estabelecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso e exclusão da gema de ovo no diluente de criopreservação, na qualidade seminal de *P. mariae*. Para isso, o sêmen fresco de cinco machos saudáveis e sexualmente maduros foi diluído (1:6), acondicionado em palhinhas (0,5 mL), congelado e armazenado em nitrogênio líquido. Foram utilizados dois tratamentos: diluente com gema de ovo (YH) e diluente sem gema de ovo (SYH). Avaliou-se motilidade, duração da motilidade, morfologia, integridade da membrana plasmática e fertilidade do sêmen descongelado, utilizando sêmen fresco como controle. Os dados foram tratados com estatística descritiva e paramétrica, com nível de confiança de 95%. Os resultados mostraram que a exclusão da gema de ovo melhorou significativamente a motilidade e a duração da motilidade, embora não tenha tido influência estatisticamente significativa na integridade da membrana plasmática, anormalidade morfológica e fertilidade. A adição da gema de ovo ao diluente de criopreservação não apresentou o efeito crioprotetor esperado. É necessário avaliar diferentes concentrações gema de ovo e suas interações com outros componentes do diluente.

INTRODUCCIÓN

Pese a ocupar menos del 1% de la superficie terrestre, los peces de agua dulce proveen cerca del 10% de la biodiversidad de especies descritas y representan alrededor de una cuarta parte de los vertebrados del mundo [1, 2]. Sin embargo, los peces son más sensibles que los organismos terrestres a los cambios en el hábitat [3]. Se estima que las tasas de extinción de los peces dulceacuícolas son entre 112 a 855 veces más altas que las tasas de extinción natural [4]. Tan solo en Colombia, la segunda nación sudamericana más biodiversa en peces de agua dulce, con 1500 especies registradas, se reportan 81 especies con algún grado de riesgo de extinción [5, 6].

La acuicultura en Colombia, es una actividad económica que ha ido en ascenso en los últimos años, dada su mayor rentabilidad en contraste con las actividades agropecuarias tradicionales, y la disminución significativa de la pesca de captura a causa de la sobreexplotación. El sector acuicultura está dominado en gran medida por la piscicultura de agua dulce interior; para el año 2017 se reportaron cerca de 120.000 toneladas de productos pesqueros, siendo el departamento del Huila el principal productor, con un aporte de 46% de la producción, seguido del departamento del Meta, con un aporte del 13% [7–9].

Prochilodus mariae Eigenmann 1922 (Characiformes: Prochilodontidae), también conocido como bocachico llanero o coporo, es una de las 13 especies del género *Prochilodus*. Es un pez migratorio y endémico de la cuenca del río Orinoco, de gran importancia ecológica, cultural y económica. Es una de las especies de la cuenca del Orinoco más explotada por las pesquerías de Colombia y Venezuela [10, 11]. Su explotación se limita a la pesca de captura, debido a que su cultivo comercial presenta bajo desempeño productivo en cuanto a la relación de la contribución de la dieta y la ganancia de peso [12]. Aunque el bocachico llanero ha sido explotado por más de 50 años, aún no se encuentra categorizado dentro de las especies en riesgo de extinción [6, 13].

Para preservar la diversidad e integridad genética del bocachico llanero, existen herramientas biotecnológicas como la crioconservación, que consiste en el almacenamiento de células viables a bajas temperaturas y largo término. El tipo de célula más crioconservada son los espermatozoides, ya que al ser relativamente más resistentes a la congelación y ocupar menos espacio, facilitan tanto su manipulación *in vitro* como su transporte desde y hacia las fincas, permitiendo el suministro constante de gametos masculinos durante cualquier época del año [14–16]. Junto con las tecnologías reproductivas, la crioconservación juega también un papel clave en los programas de mejora genética e investigación científica [17], constituyendo una alternativa viable para afrontar el bajo desempeño productivo del bocachico llanero, que ha limitado su cultivo comercial [12], aunque es sabido que, este tipo de estrategias en peces neotropicales todavía es incipiente [17].

Infortunadamente, la criopreservación induce daños celulares mediante diferentes mecanismos, tales como la formación de cristales de hielo, el estrés osmótico, el estrés oxidativo, entre otros, los cuales repercuten en la fertilidad seminal [18]. En consecuencia, se han incorporado crioprotectores tanto internos como externos al diluyente de criopreservación, con el fin de incurrir en el menor daño crioinducido y promover la supervivencia celular [19]. Los crioprotectores internos, es decir, los que penetran a la célula, son los más efectivos, aunque se ha reportado que pueden llegar a ser tóxicos [20]. Por su parte, los crioprotectores externos (crioprotectores no penetrantes) son inocuos y juegan un rol importante como estabilizadores de membrana [21]. La yema de huevo es un crioprotector externo ampliamente empleado, ya que tiene en su composición lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se adhieren a la membrana celular y la protegen del daño mecánico a causa de la formación de cristales de hielo en el exterior [22].

Para garantizar la máxima protección celular contra el daño criogénico, debe existir un protocolo de criopreservación seminal para cada especie en particular, ya que las características espermáticas difieren entre especies y, por ende, el efecto de cada uno de los parámetros de operación del protocolo sobre la calidad seminal es variable [15]. Sin embargo, existe limitado conocimiento con respecto a los protocolos de criopreservación en especies del género *Prochilodus* [19]. En este contexto, el objetivo del trabajo es evaluar el efecto del uso y la exclusión de la yema de huevo del diluyente de criopreservación, sobre la calidad seminal de *Prochilodus mariae*.

MÉTODO

Todos los procedimientos fueron realizados de conformidad con las normas y procedimientos para el uso de animales de laboratorio, descritas por el Comité on Care and Use of Laboratory Animal Resources – National Research Council, USA (1996).

Área de estudio

Los experimentos fueron realizados durante el periodo comprendido entre abril y junio de 2019, en el Laboratorio de Reproducción y Criopreservación del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, localizado en la ciudad de Villavicencio (Meta, Colombia) en las coordenadas geográficas 4°04'24.5"N 73°34'55.3"W, a una altitud de 418 msnm, temperatura ambiental media de 27°C, humedad relativa del 75% y precipitación pluvial de 4050 mm/año.

Material biológico

Se utilizaron reproductores adultos (machos y hembras) de *Prochilodus mariae* con peso corporal de $0,45 \pm 0,02$ kg y $0,92 \pm 0,11$ kg, y longitud total de $32,5 \pm 0,85$ cm y $38,5 \pm 1,75$ cm, respectivamente. Los peces fueron nacidos y criados en cautiverio en la Estación Piscícola de la Universidad de los Llanos, alimentados una vez al día, cinco veces por semana, a razón del 3% del peso vivo con pellets extruídos (24-45% de proteína bruta, dependiendo de la etapa de desarrollo).

La selección de los ejemplares se hizo con base en su madurez sexual y desarrollo corporal. La madurez sexual de los machos fue determinada por la presencia de semen en la papila urogenital después de realizar presión sobre el abdomen, mientras que en las hembras se determinó por biopsia ovárica y evaluación del estado de desarrollo de los ovocitos en estereoscopio Nikon SMZ800 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) [23]. Se seleccionaron las hembras con diámetros de ovocitos uniformes, mayor proporción de ovocitos con vesícula germinal migrando y mayor número de ovocitos viables [24, 25]. Los ovocitos viables se definieron como traslúcidos, perfectamente esféricos y sin espacio vitelino [26].

Los animales seleccionados fueron transferidos a una pileta circular de 7000 L, con recambio de agua, aireación permanente y sin alimentación. Inmediatamente, fueron caracterizados (peso, longitud estándar y longitud to-

tal) e identificados con esferas de colores adheridas a la aleta dorsal. Se mantuvieron allí durante el período de inducción hormonal hasta la espermiación y desove (aproximadamente 32 h).

Inducción hormonal

La maduración final de las gónadas se provocó mediante administración intramuscular de Extracto de Pituitaria de Carpa (*Cyprinus carpio*) - EPC (Argent Aquaculture, Redmond, WA, USA) en la base de la aleta dorsal. La ovulación fue inducida con una dosis total de 5,5 mg/kg de peso corporal, distribuida en dos aplicaciones con intervalo de 12 horas (0,5 mg/kg y 5,0 mg/kg de peso corporal). La espermiación fue inducida con una única dosis de 4 mg/kg de peso corporal, aplicada simultáneamente con la primera dosis de inducción de las hembras [27].

Obtención de gametos

Los ejemplares fueron anestesiados por inmersión en 2-Fenoxi-etanol (366 ppm; FLUKA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) hasta la pérdida del eje de nado. Posteriormente, se removieron de la solución anestésica, se secó cuidadosamente la papila urogenital y se extrajeron los gametos mediante masaje abdominal en sentido cráneo-caudal. Los ovocitos fueron colectados en recipientes de plástico limpios y secos, mientras que el semen fue colectado en tubos de ensayo graduados y estériles. Para determinar la cantidad de material obtenido, el peso (kg) del desove se calculó en balanza digital Traveler TA501 (Ohaus Co., Pine Brook, NJ, USA) y el volumen (mL) de esperma se midió directamente en el tubo de ensayo. Las muestras contaminadas con heces, sangre u orina fueron descartadas [28, 29]. La eyaculación y el desove fueron realizados aproximadamente 7-8 h después de la última dosis hormonal en la hembra.

Crioconservación

Los diluyentes fueron preparados usando cloruro de sodio (NaCl 0,9% p/v) como solución base. El diluyente sin yema de huevo (SYH) se preparó con 6% p/v de glucosa ($C_6H_{12}O_6$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 10% v/v de metanol (CH_3OH ; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). El diluyente con yema de huevo (YH) tuvo la misma concentración de glucosa y metanol que SYH, pero incluyó adicionalmente 12% v/v de yema de huevo, sin membrana vitelina. Los componentes se adicionaron en el mismo orden de mención [30].

El semen fresco fue sometido a un análisis de calidad seminal y posteriormente, fue diluido en proporción 1:6 con cada diluyente y empacado en pajillas francesas de 0,5 mL (Instrument de Médecine Vétérinaire, Minneapolis, MN, USA). Luego de esto, las pajillas fueron congeladas en vapores de nitrógeno (Dry Shipper CX100; Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA) a $-70^{\circ}C$ durante 30 min y almacenadas en nitrógeno líquido a $-196^{\circ}C$ (Deward 35 HC; Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA) durante siete días [23, 27, 29].

Para la evaluación de la calidad seminal post-crioconservación, las pajillas fueron descongeladas en baño maría a $37^{\circ}C$ durante 60 segundos (CITO products Inc., Watertown, WIS, USA). El semen descongelado fue vertido en tubos de ensayo graduados y estériles.

Evaluación de la calidad seminal

La calidad seminal se evaluó tanto en semen fresco como en semen descongelado.

Análisis cualitativo. Se registró el volumen del semen fresco obtenido y se observó la coloración para descartar una posible contaminación con heces, sangre u orina. El color ideal del semen es blanco puro o marfil [23].

Motilidad espermática. Se estimó subjetivamente mediante observación en microscopio convencional Axiostar (Carl Zeiss LLC, Thornwood, NY, USA) con un aumento de 100X, previa dilución 1:20 en solución activadora, así:

agua destilada para semen fresco y bicarbonato de sodio 1% (NaHCO_3 , Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para semen descongelado. La motilidad se expresó como porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra. Las muestras de semen fresco con movilidades inferiores al 80% no fueron procesadas [23, 29].

Duración de la motilidad. Se midió con un cronómetro digital, contabilizando el tiempo transcurrido en segundos, desde la activación de los espermatozoides hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejó de moverse.

Integridad de membrana plasmática. Fue evaluada por el método de tinción con eosina 1,1% (C.I. 45400; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – nigrosina 5,3% (C.I. 50420, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) – citrato de sodio 2,9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [31]. Se realizó un extendido en lámina portaobjeto (Microscope slides, Ground edges) utilizando 5 μL de semen y 45 μL del colorante. Luego, se analizó por microscopía óptica 100X (Primo Star, Carl Zeiss LLC, Göttingen, Germany). La integridad de membrana plasmática se expresó como porcentaje de células viables (vivas), las cuales se identificaron por permanecer incoloras. Las células teñidas correspondieron a células con integridad de membrana comprometida [32].

Concentración espermática. Fue determinada por microscopía óptica 100X (Primo Star, Carl Zeiss LLC, Göttingen, Germany) mediante recuento en cámara de Neubauer mejorada (0,1 mm de profundidad; Paul Marienfeld GmbH & Co, Lauda-Königshofen, Germany), previa dilución 1:20 en solución fijadora formol – citrato (4% v/v CH_2O 37% y 2,9% p/v $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La concentración se expresó como millones de espermatozoides por microlitro (spz/ μL) [23, 33].

Morfología. Se analizó mediante tinción con rosa de bengala 3% (Alfa Aesar, Tewksbury, MA, USA). Para ello, el semen fue fijado 1:1000 en solución formol – citrato (4% v/v CH_2O 37% y 2,9% p/v $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y almacenado en refrigeración a 4°C hasta su uso [31]. Previo al análisis, las muestras de semen fijado fueron homogenizadas mediante Vortex (Fisher Scientific™ Digital Vortex Mixer, EEUU). Posteriormente, se colocaron 15 μL de la mezcla homogenizada sobre una lámina portaobjeto, se agregaron 0,5 μL de Rosa de Bengala 3%, se homogenizó y se realizó un frotis delgado. Se analizó la morfología de los espermatozoides por microscopía óptica 100X (Primo Star, Carl Zeiss LLC, Göttingen, Germany). Se evaluaron las anomalías secundarias descritas por Miliorini *et al.* [34]. Los resultados se expresaron como porcentaje de células anormales.

Fertilidad. Se sembraron 2,0 g de desove de una única hembra con 400 μL de semen descongelado para cada uno de los tratamientos y 100 μL de semen fresco para el control (semen de un único ejemplar sano y sexualmente maduro). Los espermatozoides fueron activados con la adición de 5 mL de bicarbonato de sodio 1% y agua, para los tratamientos y el control, respectivamente. Se removió la mezcla durante un minuto. Posteriormente, se lavó con abundante agua y se incubó conforme a lo descrito por Velasco-Santamaría *et al.* [30]. Durante la incubación, se monitorearon los parámetros físicoquímicos del agua por medio de una sonda multiparamétrica (HACH HQ40D, Loveland, CO, USA). Luego de cinco horas de incubación, se tomaron muestras de ovocitos de cada uno de los tratamientos. La fertilidad se estableció como el porcentaje de ovocitos embrionados [29]. Los ovocitos embrionados se identificaron por ser esféricos y traslúcidos, en contraste con los no fertilizados, que presentan coloración blanquecina y opaca [26]. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Diseño experimental

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se evaluaron dos tratamientos experimentales y un control (semen fresco), con cinco réplicas cada uno, donde cada macho fue considerado como una réplica. El factor de estudio fue el diluyente de crioconservación, con dos niveles: yema de huevo (YH), sin yema de huevo (SYH). Las variables de respuesta analizadas fueron los parámetros de calidad post-congelación: motilidad (%), duración de la motilidad (s), integridad de membrana plasmática (%), anomalía (%) y fertilidad (%). Los valores obtenidos

en semen fresco fueron usados como control, a excepción de la prueba de fertilidad (%F), para la cual se empleó el semen de otro ejemplar sano y sexualmente maduro.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron organizados y procesados mediante estadística descriptiva, y expresados como media $\pm$ error estándar (SEM, por sus siglas en inglés). El efecto de los tratamientos en la calidad seminal se determinó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%, luego de validación de los supuestos de la estadística paramétrica: homocedasticidad (prueba de Bartlett) y normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk). Datos que no cumplieron con los supuestos, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se empleó el software estadístico GraphPad Prism 8 XML para Windows (<https://www.graphpad.com/>)

RESULTADOS

Caracterización de semen fresco

Se obtuvo, en promedio, $1,1 \pm 0,24$ mL de semen por macho ($n=5$). El semen colectado presentó una coloración blanca y una concentración promedio de $26,179 \pm 2,773$ spz $\times 10^6/\mu\text{L}$, (spz = espermatozoides).

Caracterización de ovocitos

De la hembra seleccionada se obtuvieron 130 g de desove con una concentración de 2177 ovocitos/g y diámetro ovocitario promedio de $944,4 \pm 15,95$ μm ($n=30$). La muestra aleatoria ($n=50$) de ovocitos presentó el 52% con núcleos migrando (maduros), el 28% centrales (inmaduros), el 2% periféricos (sobremaduros) y el 18% atrésicos (inviabiles).

Caracterización del agua de incubación

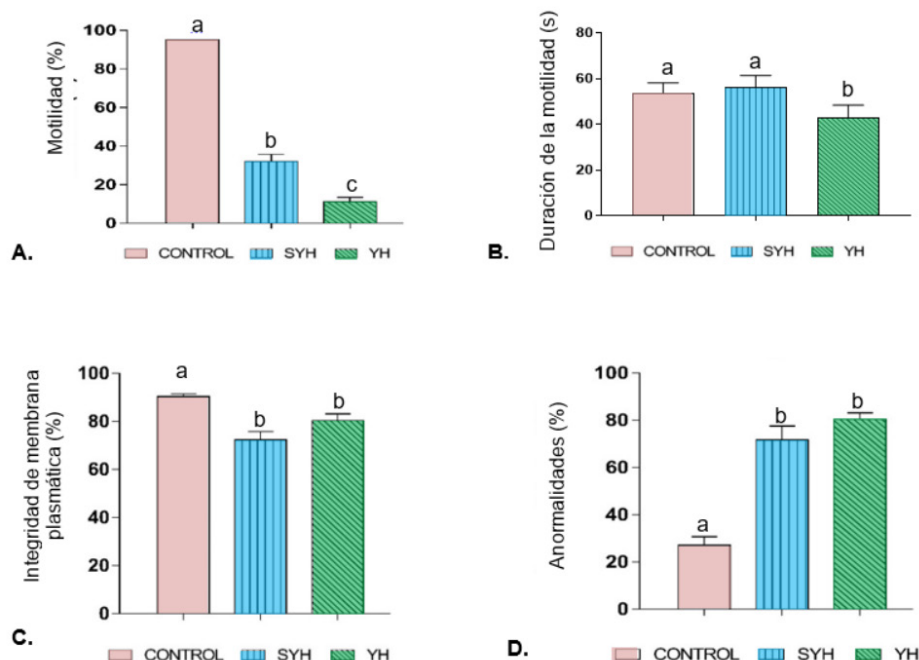
El agua de incubación presentó las siguientes características fisicoquímicas: pH de $6,5 \pm 0,007$; temperatura de $25,5 \pm 0,124^\circ\text{C}$; saturación de oxígeno del $85,8 \pm 0,709\%$; oxígeno disuelto de $6,7 \pm 0,032$ mg O_2/L ; y conductividad de $70,1 \pm 9,265$ $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Calidad seminal

La figura 1 muestra el efecto de los tratamientos YH y SYH sobre los parámetros de calidad seminal post-congelación en *P. mariae*, usando semen fresco como control.

Se evidencia que la crioconservación *per se*, influye negativa y significativamente sobre la motilidad, la integridad de membrana plasmática y la normalidad espermática, siendo ésta última la más notoria. Los tratamientos sin yema de huevo (SYH) y yema de huevo (YH) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, en cuanto a su efecto sobre la motilidad y la duración de la motilidad (Figuras 1-A y 1-B). Con el tratamiento SYH se obtuvieron los mayores valores promedio de motilidad ($32 \pm 3,7\%$) y duración de la motilidad ($56 \pm 2,3$ s), en contraste con el tratamiento YH, que permitió tan sólo el $11 \pm 2,4\%$ de motilidad con una duración de $43 \pm 2,5$ segundos. En cuanto a la morfología, pese a no haber diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, el porcentaje medio de anomalías disminuyó al omitirse la yema de huevo del diluyente de crioconservación, pasando del $80 \pm 2,7\%$ en YH al $72 \pm 6,0\%$ en SYH (Figura 1-D). En cuanto a la integridad de membrana plasmática tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, aunque con la incorporación de la yema de huevo aumentó del $72 \pm 3,4\%$ en SYH al $80 \pm 2,7\%$ en YH (Figura 1-C). La integridad de membrana plasmática fue la única variable que mejoró con el tratamiento YH.

Figura 1. Evaluación de parámetros de calidad seminal post-congelación en *Prochilodus mariae*, empleando dos diluyentes de criopreservación (YH = con yema de huevo; SYH = sin yema de huevo). Control = semen fresco. Parámetros = (A) Motilidad, (B) Duración de la motilidad, (C) integridad de membrana plasmática, (D) Anormalidad. Valores expresados como media $\pm$ SEM (n=5). Entre barras, letras distintas indican diferencia estadística ($P < 0,05$).

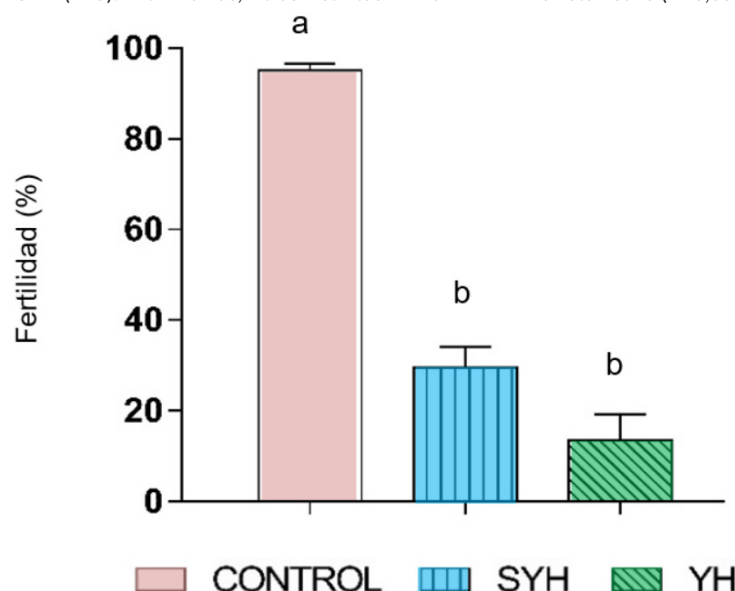


La figura 2 muestra el efecto de los tratamientos YH y SYH sobre la fertilidad seminal post-congelación en *P. mariae*, empleando como control el semen fresco de otro macho sano y sexualmente maduro. Se evidencia que la omisión de la yema de huevo (12% v/v) en el diluyente de criopreservación, no influyó significativamente sobre la fertilidad post-congelación de *P. mariae*, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, los valores de fertilidad aumentaron de $13,6 \pm 5,7\%$ en el tratamiento YH al $29,5 \pm 4,5\%$ en el tratamiento SYH (Figura 2).

En este orden de ideas, la adición 12% de yema de huevo al diluyente de criopreservación no mejoró la calidad seminal de *P. mariae*; por el contrario, limitó la motilidad y la duración de la motilidad. Se esperaba que la incorporación de yema de huevo al diluyente de criopreservación mejorara la calidad seminal post-congelación de *P. mariae*, ya que está reportado que la yema de huevo se compone de sustancias con actividad crioprotectora demostrada, tales como los fosfolípidos y las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) [16, 35]. Según Dong *et al.* [36], no debería existir diferencias significativas entre el efecto crioprotector de la yema de huevo y el efecto crioprotector de sus componentes aislados (fosfolípidos y HDL). Inclusive, según varios autores, la yema de huevo es por sí sola, un protector y estabilizador de membrana probado en varias especies, incluidos los peces [37, 38].

El efecto de la yema de huevo como crioprotector externo puede variar dependiendo del tipo de crioprotector interno y del extensor con que se combine. Por ende, se recomienda evaluar la interacción entre la yema de huevo y el resto de los componentes del diluyente de criopreservación, que podrían estar inhibiendo su acción crioprotectora [39]. Asimismo, se recomienda evaluar otros parámetros de operación, cuya influencia sobre la calidad seminal ya ha sido comprobada en otras especies [21].

Figura 2. Evaluación de la fertilidad seminal post-congelación en *Prochilodus mariae*, empleando dos diluyentes de crioconservación (YH = con yema de huevo; SYH = sin yema de huevo). Control = semen fresco. Valores expresados como media $\pm$ SEM (n=5). Entre barras, letras distintas indican diferencia estadística ($P < 0,05$).



Se reportan investigaciones en las cuales la incorporación de la yema de huevo al diluyente de crioconservación, ha mejorado notoriamente la calidad seminal post-congelación en varias especies de peces. Algunas de las concentraciones de yema de huevo que permitieron el mejor rendimiento, son: 5% para salmón de río *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae) [39] y anguila europea *Anguilla anguilla* (Anguilliformes: Anguillidae) [40]; 7% para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes: Salmonidae) [41, 42]; 10% para bagre africano *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) [43], perca amarilla *Perca flavescens* (Perciformes: Percidae) y lucio del norte *Esox lucius* (Esociformes: Esocidae); 15% para pez gato andador *Clarias batrachus* (Siluriformes: Clariidae) [44] y carpa común *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) [45]. Sin embargo, aunque la incorporación de yema de huevo ha optimizado la calidad seminal post-congelación en estas especies, en otros peces como el salvelino *Salvelinus alpinus* (Salmoniformes: Salmonidae) y el aspí *Aspius aspius* (Cypriniformes: Cyprinidae), la calidad seminal post-congelación ha decrecido [44]. De igual modo, en cachama negra *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminae) se encontró que es mejor para la calidad seminal post-congelación omitir la yema de huevo al 12% que incorporarla en el diluyente de crioconservación [31].

Además, ya existen varios protocolos de crioconservación seminal de peces, en los cuales la yema de huevo está contenida dentro de la formulación del diluyente de crioconservación. En el protocolo para yamú *Brycon amazonicus* (Characiformes: Characidae) se establece una concentración de yema de huevo del 12% v/v [23]; en el protocolo para salmón de río *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae) se establece una concentración del 5% [46]; en el protocolo para *Salmonidae* se establece una concentración del 6 al 8% p/v [47]; en el protocolo para cachama negra *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminae) se establece una concentración del 5% [22]; en el protocolo para mero gigante *Epinephelus lanceolatus* (Perciformes: Serranidae) se establece una concentración del 5 al 10% v/v [48]; en el protocolo para trucha arcoíris *Salmo gairdneri* (Salmoniformes: Salmonidae) se establece una concentración del 5 al 20% v/v (preferiblemente al 10%) [49]; en el protocolo para boga *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae) se establece una concentración del 10% [50] 1836. Asimismo, para el proceso de vitrificación de semen de esturión *Acipenser* spp. (Acipenseriformes: Acipenseridae)

dae) se establece una proporción de 8 a 12 partes de yema de huevo [51]. Con base en esto, se evidencia que en todos los protocolos e investigaciones citadas, la concentración de yema de huevo óptima varía con respecto a la especie con que se esté trabajando.

En cuanto a especies del género *Prochilodus*, Felizardo *et al.* [33] crioconservaron semen de sábalo jetón *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) con un diluyente a base de yema de huevo al 5%, metanol al 8% y BTS (Beltsville Thawing Solution®) al 5% y obtuvieron motilidades post-congelación superiores al 60% con una duración de más de 70 s y anormalidades post-congelación inferiores al 30%. No obstante, cuando se modificó la composición del diluyente (8% yema de huevo, 10% metanol y 5% BTS) se evidenció un leve descenso de la motilidad al 50% y de la duración de la motilidad a 26 s [52]. Por su parte, Atencio *et al.* [53, 54] crioconservaron semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae) con un diluyente a base de yema de huevo al 12%, glucosa al 5,5% y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%, y obtuvieron valores promedio de motilidad post-congelación del 76% y una fertilidad del 70%. Sin embargo, cuando sustituyeron el DMSO por dimetil acetamida (DMA) al 8%, los valores de motilidad se redujeron al 31% y la fertilidad al 60%. Con base en lo anterior, se evidencia que así se trabaje con la misma especie, el efecto de la yema de huevo sobre la calidad seminal post-congelación depende tanto del extensor y del crioprotector interno con que se combine.

En vista de que la concentración de yema de huevo establecida en cada protocolo de crioconservación varía conforme a la especie de pez con que se trabaje, y que el protocolo de crioconservación seminal para *Prochilodus* spp. todavía no ha sido estandarizado [15, 19, 55] no es aconsejable crioconservar semen de *P. mariae* con diluyentes descritos en protocolos específicos para otras especies. Es necesario evaluar el efecto crioprotector de la yema de huevo a diferentes concentraciones, hasta encontrar el porcentaje óptimo para *P. mariae*. Las patentes europeas EP2043431B1 y ES2672630T3 establecen que la proporción de yema de huevo en el diluyente de crioconservación puede variar entre el 1 al 23% de yema de huevo, independientemente de la especie [56, 57]; mientras que otros investigadores recomiendan un 20%, en general [58, 59].

CONCLUSIONES

La yema de huevo no presentó el efecto crioprotector esperado, ya que los tratamientos con yema de huevo (YH) y sin yema de huevo (SYH) no exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre sí en cuanto a su efecto sobre la integridad de membrana plasmática, la morfología y la fertilidad post-congelación en *Prochilodus mariae*. Por el contrario, al omitirse la yema de huevo se mejoró la motilidad y la duración de la motilidad post-congelación.

Se recomienda, evaluar diferentes proporciones de yema de huevo en el diluyente de crioconservación, antes de optar por retirarla de la formulación. Asimismo, es recomendable evaluar la interacción de la yema de huevo con otros componentes del diluyente de crioconservación, así como, la influencia de otros parámetros de operación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia por la beca-pasantía del autor Astrid Stefania Duarte-Trujillo. Asimismo, agradecen al fondo de Social de Educación Superior de la Gobernación del Meta (FSSES) por la beca doctoral del autor Víctor Mauricio Medina-Robles. También agradecen al Instituto de Acuicultura – IALL, por el apoyo logístico y por prestar las instalaciones para el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] SMITH, KEVIN G.; DARWALL, WILLIAM; BARRIOS, VIOLETA; NUMA, KATHERINE; ISFENDIYAROĞLU, SÜREYYA. Background to freshwater biodiversity in the eastern mediterranean. En: The status and distribution of freshwater biodiversity in the eastern Mediterranean. Cambridge (UK), Malaga (Spain) and Gland (Switzerland): International Union for Conservation of Nature (IUCN), 2014, p. 1-7.
- [2] FREYHOF, JÖRG; BROOKS, EMMA. European Red List of Freshwater Fishes. Luxembourg (Luxemburgo): Office of the European Union, 2011, 70 p.
- [3] VOLPEDO, ALEJANDRA; THOMPSON, GUSTAVO-ARIEL. Environmental changes on freshwater fish communities in South America in the last five decades: a case study in northeast Argentina. Sustainability, Agri, Food and Environmental Research, v. 4, n. 3, 2017, p. 47-61.
<http://dx.doi.org/10.7770/safer-V4N3-art1047>
- [4] TEDESCO, PABLO A.; BEAUCHARD, OLIVIER; BIGORNE, RÉMY; BLANCHET, SIMÓN; BUISSON, LAËTIA; CONTI, LORENZA; CORNU, JEAN-FRANÇOIS; DIAS, MURILO S.; GRENOUILLET, GAËL; HUGUENY, BERNARD; JÉZÉQUEL, CÉLINE; LEPRIEUR, FABIEN; BROSSE, SÉBASTIEN; OBERDORFF, THIERRY. Data Descriptor: A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. Scientific Data, 4, 2017, p.1-6.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2017.141>
- [5] REIS, R.E.; ALBERT, J.S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. Journal of Fish Biology, v. 89, n. 1, 2016, p. 12-47.
<https://doi.org/10.1111/jfb.13016>
- [6] MOJICA, J.I.E.; USMA-OVIEDO, J.U.E.; ALVAREZ-LEÓN, R.E.; LASSO, C.A. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Bogotá D.C. (Colombia): Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales, 2012, p. 154-159.
- [7] ITALIA. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). Visión general del sector acuícola nacional - Colombia [online]. Disponible: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es#tcN900B1 [citado 25 de enero de 2020].
- [8] FRANCIA. ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICOS (OCDE). Pesca y acuicultura en Colombia. Bogotá D.C. (Colombia): 2016, 34 p.
- [9] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Protección sanitaria de las especies acuícolas [online]. 2019. Disponible: [https://www.ica.gov.co/getdoc/b082c759-18c7-47da-bed6-0ebe76b48fe0/acuicolas-\(1\).aspx](https://www.ica.gov.co/getdoc/b082c759-18c7-47da-bed6-0ebe76b48fe0/acuicolas-(1).aspx) [citado 25 de enero de 2020].
- [10] RAMÍREZ-GIL, HERNANDO; AJIACO-MARTINEZ, ROSA; BARRETO-REYES, CARLOS. Tallas de captura de *Prochilodus mariae* en la parte alta del río Meta, Orinoquia colombiana. Orinoquia, v. 19, n. 2, 2015, p. 174-185.
<https://doi.org/10.22579/20112629.317>
- [11] DO-NASCIMIENTO, CARLOS; HERRERA-COLLAZOS, EDGAR-ESTEBAN; HERRERA, GUIDO A.; ORTEGA-LARA, ARMANDO; VILLA-NAVARRO, FRANCISCO A.; USMA-OVIEDO, JOSÉ-SAULO; MALDONADO-OCAMPO, JAVIER A. Checklist of the freshwater fishes of Colombia: a Darwin Core alternative to the updating problem. ZooKeys, v. 708, 2017, p. 25-138.
10.3897 / zookeys.708.13897
- [12] ORTEGA, JHOANA; YOSSA, MARTHA. Desempeño productivo del coporo con dietas isotópicas. Orinoquia (Suplemento), v. 18, n. 2, 2014, p. 278-285.
<https://doi.org/10.22579/20112629.387>
- [13] SWITZERLAND. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). The IUCN red list of threatened species [online]. Disponible: <https://www.iucnredlist.org/> [citado 10 de octubre de 2019].
- [14] RAMIREZ-MERLANO, JUAN A.; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR M.; CRUZ-CASALLAS, P.E. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. Orinoquia, v. 14, n. 1, 2010, p. 59-71.
<https://doi.org/10.22579/20112629.128>

- [15] MARTÍNEZ-PÁRAMO, SONIA; ÁKOS, HORVÁTH; LABBÉ, CATHERINE; ZHANG, TIAN TIAN; ROBLES, VANESA; HERRÁEZ, PAZ; SUQUET, MARC; ADAMS, SEREAN; VIVEIROS, ANA; TIERSCHK, TERRENCE; CABRITA, ELSA. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, v. 472, 2017, p. 156–177.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>
- [16] CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, V.; HERRÁEZ, M.P. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, n. 5, 2010, p. 623–635.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- [17] MARTÍNEZ, JOSÉ-GREGORIO; ATENCIO-GARCIA, VÍCTOR; PARDO-CARRASCO, SANDRA. DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi: Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 3, 2012, p. 577–586.
<https://doi.org/10.1590/S1679-62252012005000018>
- [18] CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PARAMO, S.; GAVAI, P.J.; RIESCO, M.F.; VALCARCE, D.G.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M.P.; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, v. 432, 2014, p. 389–401.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>
- [19] MARTÍNEZ, J.G.; TARAZONA-MORALES, A.M.; PARDO-CARRASCO, S.C. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. *Animal Reproduction*, v. 9, n. 1, 2012, p. 19–26.
- [20] BENSON, JAMES D. Modeling and Optimization of Cryopreservation. En: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Hertfordshire (UK): Humana Press, 2015, p. 83–120.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_3
- [21] VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, 2009, p. 137–150.
<https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>
- [22] CARNEIRO, PAULO; AZEVEDO, HYMERSON C.; SANTOS, JADSON P.; ALEXANDRE, MARIA. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters*, v. 33, n. 5, 2012, p. 385–393.
- [23] CRUZ-CASALLAS, PABLO; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR; VELASCO-SANTAMARÍA, YOHANA. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 19, n. 2, 2006, p. 146–151.
- [24] PARDO-CARRASCO, SANDRA; ARIAS-CASTELLANOS, JOSÉ; SUÁREZ-MAHECHA, HÉCTOR; CRUZ-CASALLAS, PABLO; VÁSQUEZ-TORRES, WALTER; ATENCIO-GARCÍA, VÍCTOR; ZANIBONI-FILHO, EVOY. Inducción a la maduración final y ovulación del yamú *Brycon amazonicus* con EPC y mGnRH-a. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 19, n. 2, 2006, p. 160–166.
- [25] AYA, ELIZABETH; ARIAS, JOSÉ. Reproducción inducida de *Pimelodus pictus* con extracto de hipófisis de carpa (EHC) y Ovaprim®. *Induced spawning of Pimelodus pictus with carp hypophysis*. *Revista MVZ Córdoba*, v. 6, n. 1, 2011, p. 2317–2323.
- [26] CRUZ-CASALLAS, PABLO; LOMBO-RODRÍGUEZ, DORA; VELASCO-SANTAMARÍA, YOHANA-MARÍA. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research*, v. 36, n. 7, 2005, p. 682–686.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01273.x>
- [27] RAMÍREZ-MERLANO, JUAN-ANTONIO; VELASCO-SANTAMARÍA, YOHANA-MARÍA; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR-MAURICIO; CRUZ-CASALLAS, PABLO-EMILIO. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachipomus* (Cuvier 1818). *Aquaculture Research*, v. 42, n. 6, 2011, p. 738–745.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02835.x>
- [28] CRUZ-CASALLAS, PABLO-EMILIO; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR; VELASCO-SANTAMARÍA, YOHANA-MARÍA. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 19, n. 2, 2006, p. 152–159.

- [29] MEDINA-ROBLES, VÍCTOR-MAURICIO; CRUZ-CASALLAS, PABLO-EMILIO. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación- descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). Archivos de medicina veterinaria, v. 39, n. 3, 2007, p. 229–237.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2007000300006>
- [30] VELASCO-SANTAMARÍA, YOHANA-MARÍA; MEDINA-ROBLES, VÍCTOR-MAURICIO; CRUZ-CASALLAS, PABLO-EMILIO. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture, v. 256, n. (1–4), 2006, p. 264–271.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.039>
- [31] MEDINA-ROBLES, VÍCTOR-MAURICIO; GUAJE-RAMÍREZ, DIANA; MARIN-COSSIO, LAURA; SANDOVAL-VARGAS, LEYDY; CRUZ-CASALLAS, PABLO-EMILIO. Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. Orinoquia, v. 23, n. 1, 2019, p. 15–24.
<http://dx.doi.org/10.22579/20112629.537>
- [32] VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. Semen cryopreservation of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), an endangered Brazilian species. En: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Boca Ratón (USA): CRC Press, 2008, p. 361–365.
<https://doi.org/10.1201/9780849380549-27>
- [33] FELIZARDO, V.D.O.; MELLO, R.A.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, E.S.; DRUMOND, M.M.; ROSA, P.V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. Animal reproduction science, v. 122, n. (3–4), 2010, p. 259–263.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.020>
- [34] MILIORINI, ALÉSSIO-BATISTA; SOLIS-MURGAS, LUIS-DAVID; VIEIRA-ROSA, PRISCILA; OBERLENDER, GUILHERME; MACHADO-PEREIRA, GILMARA-JUNQUEIRA; VICENTE-DA COSTA, DIEGO. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. Aquaculture Research, v. 42, n. 2, 2011, p. 177–187.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x>
- [35] PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; BEIRÃO, J.; PAEZ-HERRÁEZ, MARÍA. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. Theriogenology, v. 74, n. 2, 2010, p. 282–289.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.012>
- [36] DONG, XIANG-DONG; RODENBURG, SARAH; HILL, DANA; VANDERVOORT, CATHERINE. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. Asian journal of andrology, v. 13, n. 3, 2011, p. 459–464.
<https://doi.org/10.1038/aja.2010.145>
- [37] FARLEY, JANE; OSTERMEIER, CHARLES; TAFT, ROBERT; WILES, MICHAEL V. Sperm cryoprotective media. AU 2012203918 A1. Melbourne (Australia): 2012.
- [38] DIWAN, A.D.; AYYAPPAN, S.; LAL, K.K.; LAKRA, W.S. Cryopreservation of fish gametes and embryos. The Indian Journal of Animal Sciences, v. 80, n. 4, 2010, p. 109–124.
- [39] ALEXANDRE-NÍZIO, MARÍA; VIVEIROS, ANNA; FONSECA-DE FREITAS, RILKE-TADEU; OLIVEIRA, ALEXMILIANO V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture, v. 260, 2006, p. 298–306.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.011>
- [40] HERRANZ-JUSDADO, JUAN-GERMAN; GALLEGO, VÍCTOR; ROZENFELD, CHRISTOFFER; MORINI, MARÍA; PÉREZ, LUZ; ASTURIANO, JUAN. European eel sperm storage: optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes. Aquaculture, v. 506, 2019, p. 42–50.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.019>
- [41] LAHNSTEINERL, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout. Journal of Applied Ichthyology, v. 12, 1996, p. 99–106.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1996.tb00070.x>

- [42] LAHNSTEINER, FRANZ. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research*, v. 31, n. 3, 2000, p. 245–258.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00452.x>
- [43] RURANGWA, EUGÉNE; VOLCKAERT, FILIP; HUYSKENS, GEERT; KIME, DAVID E.; FRANS, OLLIVIER. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, v. 55, n. 3, 2001, p. 751–769.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00441-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00441-1)
- [44] MUCHLISIN, Z.A. Current Status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas*, v. 6, n. 1, 2005, p. 66–69.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d060114>
- [45] BOZKURT, YUSUFUT; YAVAS, ILKER; CENGİZ, YILDIZ. Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Aquaculture international*, v. 22, 2014, p. 131–139.
<https://doi.org/10.1007/s10499-013-9728-4>
- [46] VIVIANE-DE OLIVEIRA, FELIZARDO; VIEIRA-MELO, CARLOS-CICINATO; SOLIS-MURGAS, LUIS-DAVID; DE SOUZA-ANDRADE, ESTEFÂNIA; NAVARRO, RODRIGO-DIANA; FONSECA-DE FREITAS, RILKE-TADEU. Optimization of artificial propagation in piracanjuba fish *Brycon orbignyanus* using cryopreserved semen. *CryoLetters*, v. 37, n. 5, 2016, p. 330–334.
- [47] ALEANDRI, RICARDO; GALLI, ANDREA. Method for cryopreservation of teleostei semen. CA 2.388.741 A1, Classification A01N1/02. Gatineau (Canadá): 2001.
- [48] LIU, Q. *et al.* A kind of sub- Large Copacity of *epinephelus lanceolatus* milt, the method for high-efficiency ultra-low temperature freeze protective. CN 105.532.639 B, Classification A01N1/0221. Qingdao (China): 2018.
- [49] BAYNES, STHEPEN M.; SCOTT, ALEXANDER. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, v. 66, n. 1, 1987, p. 53–67.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90283-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90283-3)
- [50] TAITSON, PAULO-FRANCO; CHAMI, E.; PEREIRA-GODHINO, HELOISA. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Animal reproduction science*, v. 105, n. (3–4), 2008, p. 283–291.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.009>
- [51] ZHAO, Z.; ZHAO, W. Vitrification freezing method for sturgeon sperms. CN 103.931.607 A, Classification A01N1/02. Hengyang (China): 2014.
- [52] VASCONCELOS-NOGUEIRA, ANA-CARINA; SOUZA-DE CARVALHO, ALINE-FERREIRA; FREITAS-GARCIA, RAYCON-ROBERTO; ELIZIANNE-RAMOS, SHAYENNE; SOLIS-MURGAS, LUIS-DAVID. Cryopreservation of *prochilodus lineatus* semen: Effect of cryoprotectants combination. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 41, 2015, p. 817–824.
<https://doi.org/10.20950/1678-2305.2015v41nep817>
- [53] ATENCIO-GARCÍA, VÍCTOR; SPINOSA, JOSÉ; MARTÍNEZ, JOSÉ; PARDO-CARRASCO, SANDRA. Insemination of bocachico fish (*Prochilodus magdalenae*) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 28, 2015, p. 347–355.
<http://dx.doi.org/10.17533/udea.rccp.v28n4a07>
- [54] ATENCIO-GARCÍA, VÍCTOR; MARTÍNEZ, JOSÉ; PARDO-CARRASCO, SANDRA. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Archivos de medicina veterinaria*, v. 45, 2013, p. 151–158.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200006>
- [55] ASTURIANO-NEMESIO, JUAN-FRANCISCO; CABRITA, ELSA; HORVÁTH, ÁKOS. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and comparative endocrinology*, v. 245, 2016, p. 69–76.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>

-
- [56] OSTERMEIER, G.C. *et al.* Sperm cryoprotective media. EP 2.043.431 B1, Classification A01N1/0221. Múnich (Alemania): 2018.
 - [57] OSTERMEIER, G.C. *et al.* Sperm cryoprotectants. ES 2.672.630 T3, Classification A01N1/0221. Madrid (España): 2018.
 - [58] HERICKHOFF, L.A. *et al.* System and substances for cryopreservation of viable cells. US 20.150.037.783 A1, Classification C12N5/0693. Fort Collins (USA): 2015.
 - [59] HERICKHOFF, L.A. *et al.* Methods and systems for synergistic continuity approaches to treatment and preservation of biological cells. WO 2.019.104.184 A1, Classification A01N1/0226. Fort Collins (USA): 2019.

Ácidos ganodéricos en *Ganoderma sp*, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado*

Ganoderics acids from *Ganoderma sp*, *Ganoderma lucidum* and exhausted substrate

Ácidos ganodéricos na *Ganoderma sp*, *Ganoderma lucidum* e em seu substrato esgotado

RAMÍREZ-AYALA, WILDER¹; GUEVARA-BRAVO, CARLOS-ALBERTO²;
RODRÍGUEZ-ESPINOSA, JHON-ALEXANDER³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 22 de Mayo 2019.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

- * Título del proyecto de origen: "Compuestos Bioactivos de *Ganoderma lucidum*, de su sustrato agotado y de *Ganoderma silvestre* de la zona; obtenidos mediante flúidos supercríticos y analizados por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)". Financiación Universidad del Quindío. Culminación Junio de 2018.
- 1 Universidad del Quindío, Maestría en Química, Grupo de Investigación en Ciencias Ambientales (INCIAM). Licenciado en Biología y Educación Ambiental, Magister en Química. Armenia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6988-9483>
 - 2 Universidad del Quindío, Maestría en Química, Grupo de Investigación en Ciencias Ambientales (INCIAM). Doctor en Ciencias Químicas. Armenia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7237-4197>
 - 3 Universidad del Quindío, Maestría en Química, Grupo de Investigación en Ciencias Ambientales (INCIAM). Magister en Química. Armenia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7445-1662>

Correspondencia: inciam@uniquindio.edu.co

Cómo citar este artículo: RAMÍREZ-AYALA, WILDER; GUEVARA-BRAVO, CARLOS-ALBERTO; RODRÍGUEZ-ESPINOSA, JHON-ALEXANDER. Ácidos ganodéricos en *Ganoderma sp*, *Ganoderma lucidum* y en su sustrato agotado. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021. DOI: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)206-216](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)206-216)

RESUMEN

Los hongos del Género *Ganoderma* son reconocidos mundialmente por sus propiedades medicinales y su mercado nacional e internacional crece continuamente. Con el objetivo de indagar acerca del potencial comercial de nuestra diversidad fúngica, se determinaron los contenidos de compuestos bio-activos, conocidos como Ácidos Ganodéricos (A.G.), a partir de tres fuentes del hongo. De los cuerpos fructíferos de dos variedades de *Ganoderma* sp y *Ganoderma lucidum* (silvestre y comercial). La variedad silvestre fue recolectada en el municipio de Quimbaya Quindío, la comercial, certificada, se cultivó sobre residuos agroindustriales de plátano y el sustrato agotado fue obtenido después de la recolección de la variedad comercial. Las tres muestras obtenidas por triplicado, fueron secadas y sometidas a extracción con fluidos supercríticos y por ultrasonido. La concentración de A.G. se determinó por Cromatografía Líquida (HPLC), por el método de normalización de áreas, usando como estándar el Ácido Ganodérico A. Los mayores rendimientos de extracción fueron obtenidos por el método de ultrasonido, independientemente de la muestra analizada. El mayor contenido de A.G., fue encontrado en la cepa silvestre (266 µg/g), aproximadamente 30% más que en la variedad comercial, aunque considerablemente menor a estudios internacionales. Es posible concluir que la variedad silvestre tendría potencial para convertirse en una fuente comercial de A.G.

ABSTRACT

Ganoderma genus are recognized worldwide for their medicinal properties and their national and international market is continuously growing. In order to investigate the commercial potential of our fungal diversity, the contents of bioactive compounds, known as Ganodic Acids (A.G.), were determined from three sources of fungus. Of the fruiting bodies of two varieties of *Ganoderma* sp and *Ganoderma lucidum* (wild and commercial). The wild variety was collected in the municipality of Quimbaya Quindío, the commercial, certified, was developed on agro-industrial plantain waste and the spent substrate were obtained after the harvesting of the commercial variety. The three samples obtained in triplicate, were dried and subjected to extraction with supercritical fluids and ultrasound. The concentration of A.G. was determined by Liquid Chromatography (HPLC), by the method of normalization of areas, using as standard Ganoderic Acid A. The method of extraction by ultrasound was the most efficient in all cases. The highest content of A.G., was found in the wild strain (266 µg/g), approximately 30% more than in the commercial variety, although considerably less than international studies. It is possible to conclude that the wild variety would have the potential to become a commercial source of A.G.

RESUMO

Os fungos do gênero *Ganoderma* são reconhecidos mundialmente por suas propriedades medicinais e seu mercado nacional e internacional está crescendo continuamente. A fim de investigar o potencial comercial da nossa biodiversidade fúngica, o conteúdo de compostos bioativos, conhecidos como Ácidos Ganodéricos (A.G.), foi determinado a partir de três fontes de fungos.

PALABRAS CLAVE:

Cultivo; Basidiomicetos; Cepa nativa; Extracción; Metabolitos secundarios; Cromatografía; *Ganoderma lucidum*.

KEYWORDS:

Culture; Basidiomycetes; Wild strain; Extraction; Secondary metabolites; Chromatography; *Ganoderma lucidum*.

PALABRAS-CHAVE:

Cultura; Basidiomiceto; Linhagem nativa; Extração; Metabolitos secundários; Cromatografia; *Ganoderma lucidum*.

Dos corpos frutíferos de duas variedades de Ganoderma sp e Ganoderma lucidum (silvestre e comercial). A variedade silvestre foi coletada no município de Quimbaya Quindío, a comercial, certificada, foi desenvolvida sobre resíduos de bananeira agroindustrial e do substrato gasto obtido após a colheita da variedade comercial. As três amostras obtidas em triplicata, foram secas e submetidas à extração com fluidos supercríticos e ultra-som. A concentração de A.G. foi determinado por Cromatografia Líquida (HPLC), pelo método de normalização de áreas, utilizando como padrão o Ácido Ganodérico A. O método de extração por ultrassom foi o mais eficiente em todos os casos. O maior teor de A.G., foi encontrado na estirpe selvagem (266 µg/g), aproximadamente 30% mais do que na variedade comercial, embora consideravelmente menos do que os estudos internacionais. É possível concluir que a variedade silvestre teria o potencial de se tornar uma fonte comercial de A.G.

INTRODUCCION

El hongo *Ganoderma lucidum*, Lingzhi o Mannetake es conocido en la cultura China y japonesa, desde hace más de 2000 años y se consume con frecuencia, ya que además de ser fuente de nutrientes, tiene propiedades nutracéuticas. En las últimas décadas se han acumulado pruebas científicas sobre la aplicación médica del hongo en el tratamiento de varios tipos de dolencias como bronquitis, anorexia, gastritis, hepatitis, nefritis, hemorroides, dismenorrea, estreñimiento, lupus, enfermedades crónicas como migraña, hipertensión, artritis, asma, diabetes, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, e inclusive el cáncer [1]. Los compuestos bio-activos a los que se les atribuyen estas propiedades son los Ácidos Ganodéricos (A.G.) y los Beta-glucanos, entre otros [2].

Actualmente, los hongos del género *Ganoderma*, son utilizados, no solo para el consumo en fresco o seco, sino, además para la producción de diversos productos alimenticios funcionales y nutracéuticos [3,4,5].

En Colombia y en el resto del mundo, continuamente, se realizan cultivos con cepas certificadas, sobre residuos agroindustriales, específicos de cada región, buscando encontrar las formulaciones que permitan los mayores rendimientos de producción y concentraciones de compuestos bio-activos, como los A.G. [6,7].

En el Departamento del Quindío se han encontrado cepas silvestres de *Ganoderma*, adaptadas a nuestros ecosistemas y que pueden contener los compuestos bio-activos en concentraciones que pueden llegar a ser de interés comercial.

Por las anteriores razones, es de gran importancia estudiar en términos de análisis cualitativos y cuantitativos, la presencia y cantidad de los compuestos bio-activos de *Ganoderma*, presentes en cepas silvestres y comerciales, e inclusive en la biomasa, donde se han desarrollado estos hongos (sustrato agotado o residual) [8, 9, 10, 11, 12, 13].

Varios métodos de extracción con solventes, han sido desarrollados con el propósito de obtener los compuestos bio-activos del género *Ganoderma* [14,15,16], siempre buscando aumentar los rendimientos para desarrollar futuras aplicaciones comerciales, disminuir los costos y evitar la degradación de las sustancias de interés.

La extracción con fluido supercrítico (SFC), es una técnica que ha permitido la extracción, de compuestos bio-activos de *Ganoderma*, utilizando bajas temperaturas y altas presiones [17, 18, 19]. Además, por su reducido consumo y bajo costo de solventes, manejo automatizado de la muestra y alta eficiencia, se convierte en una alternativa viable en éste tipo de investigaciones [20]. De forma alternativa, la técnica de ultrasonido o sonicación intensa, se ha evaluado [21, 22], en este caso, con el fin de extraer ácidos Ganodéricos, la membrana celular debe ser destruida. Para la disrupción, se requiere encontrar un procedimiento adecuado de extracción y así lograr la liberación de todos los productos [23].

Los Ácidos Ganodéricos pueden ser separados, identificados y cuantificados, utilizando la técnica de Cromatografía Líquida (HPLC) [24, 25, 26], acoplada a detector UV-Vis. Esta técnica es ampliamente usada, por su rapidez y eficiencia, dado que mediante la comparación con estándares externos e internos, es posible la identificación y cuantificación de las sustancias presentes.

En ésta investigación se comparó la técnica de extracción con fluido supercrítico (SFC) con la técnica de extracción con ultrasonido (EUA), tomando como base la concentración de Ácidos Ganodéricos obtenidos al final del proceso.

En ésta investigación, se extrajeron los Ácidos Ganodéricos, presentes en el cuerpo fructífero y el sustrato agotado del hongo *Ganoderma lucidum*, mediante las técnicas de extracción con fluido supercrítico (SFC) y extracción con ultrasonido (EUA). Se identificaron y cuantificaron mediante la cromatografía líquida (HPLC), acoplada a espectrofotometría UV-Vis.

MÉTODO

Obtención de *Ganoderma sp*

Los cuerpos fructíferos de *Ganoderma sp*, fueron colectados cerca de la reserva el ocaso (4°58'73.8"N - 75°85'52.4"W), en el municipio de Quimbaya, Quindío.

Semilla de *Ganoderma lucidum* comercial

Para la siembra de *G. lucidum* sobre residuos de plátano, se utilizó una semilla certificada, proporcionada por la planta de bio-procesos y agroindustria de la Universidad de Caldas. Esta semilla fue obtenida por inoculación del micelio de *G. lucidum* sobre cebada

Cultivo de *G. lucidum*

Como sustrato para la producción, se utilizaron subproductos del monocultivo de plátano (pseudotallos, hojas y raquis), fraccionados en cortes de aproximadamente 1 cm², esterilizados y formulados para obtener relaciones de Carbono/Nitrógeno del orden de 40 a 60. El proceso se llevó a cabo en la granja Bengala (4°41'08.8"N 75°37'02.9"W), propiedad de la Universidad del Quindío, ubicada en el municipio de Finlandia (Quindío). Después de 38 semanas de crecimiento, fueron recolectados los cuerpos fructíferos y además el sustrato agotado.

Tratamiento de la muestra

Los cuerpos fructíferos de *G. lucidum* cultivado sobre residuos de plátano, de la especie *Ganoderma sp* y el sustrato agotado, se secaron y deshidrataron a 40°C por 24 horas; de allí, se tomaron por separado para ser triturados, utilizando un molino convencional y luego fueron tamizados hasta alcanzar la pulverización homogénea en un tamaño de 50 µm, de forma similar a lo reportado por algunos autores [1, 27]

Extracción con fluido supercrítico (SFC)

Este procedimiento, se llevó a cabo en el instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Manizales. Se utilizó solvente supercrítico (CO₂) y solvente etanol, a 300 bar de presión, durante 1 hora y con temperatura de 40°C, secuencialmente controlados [28]. Se colocaron 15 g de muestra pulverizada en la cámara de extracción del reactor dentro de una funda de lienzo. Fueron obtenidos 6 extractos, pertenecientes a cada una de las muestras por duplicado

Extracción con ultrasonido (EUA)

Fue realizada en el laboratorio de catálisis de la universidad del Quindío en un sonicador BRANSON 1800 de 45 MHz, durante 30 minutos [30]. Se depositaron 2 g del pulverizado y se disolvieron en 20 mL de etanol de 95%, contenidos en un vaso de precipitado de 50 mL. Se dejaron reposar durante 24 horas, luego, de la parte sobrenadante de cada uno, se filtró 1 mL dentro de los viales para HPLC, usando PVDF de 0,45 µm Millipore millex-HV.

Preparación del estándar y adición a los extractos

5 mg del estándar de Ácido Ganodérico A, (SIGMA-ALDRICH®) se disolvieron en 5 mL de etanol grado HPLC. De esta disolución madre, se preparó una disolución a 50 µg/mL, usando etanol como disolvente. A cada uno de los extractos, debidamente diluidos, para conservar las proporciones, se les adicionó una concentración fija de Ácido Ganodérico A.

Cromatografía y cuantificación

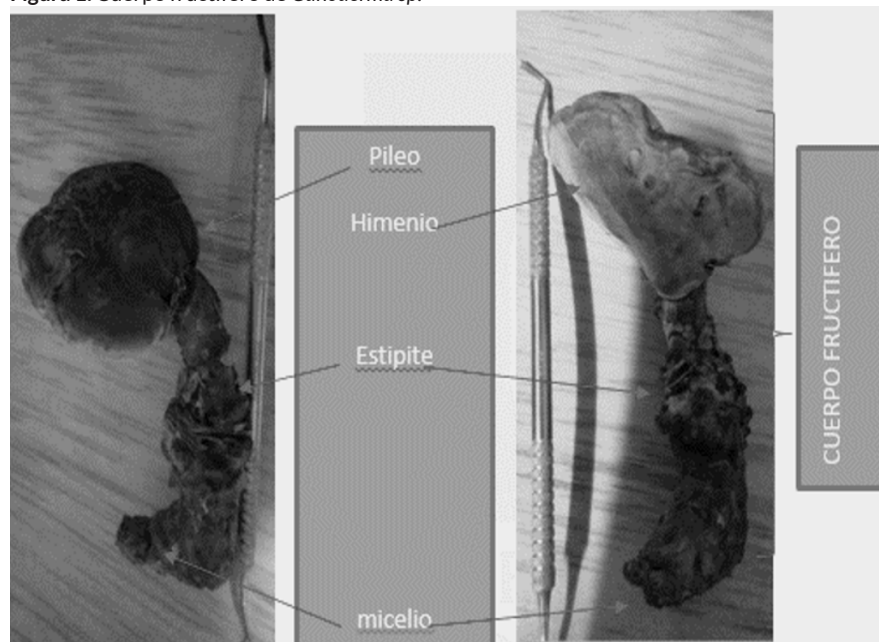
Los extractos fueron inyectados en el cromatógrafo líquido Thermo Dionex 3000, en las condiciones que a continuación se describen: Columna de separación ACE AQ C-18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 micras), y fase móvil de ácido fórmico al 0,5 % y acetonitrilo en proporciones 60 (A) y 40 (B) en modo isocrático. Se utilizó un sistema de detección UV-Vis con arreglo de diodos (DAD), a 250 y 280 nm. La cuantificación de los Ácidos Ganodéricos se realizó por el método de normalización de áreas, comparando el área del Ácido Ganodérico A (de concentración conocida), con el área de los picos de Ácidos Ganodéricos, presentes en la muestra.

Identificación *Ganoderma sp*

Aunque de éste hongo se conocen más de 250 especies reportadas en todo el mundo, la cepa silvestre pudo ser clasificada usando la metodología empleada en la taxonomía tradicional, al tener en cuenta el análisis de las características morfológicas del cuerpo fructífero recolectado.

La clave taxonómica que se tuvo en cuenta fue reportada por Weber en 2009 [31]. En éste género, se pudo observar la presencia de un píleo o sombrero en forma de repisa mientras que la parte inferior del esporocarpio presenta una multitud de poros que ratifican de que se trata de una especie polyporaceae (Figura 1). Además, el olor a madera añejada y su color café brillante, son característicos del género, por lo que se pudo clasificar ésta cepa silvestre como *Ganoderma sp*.

Figura 1. Cuerpo fructífero de *Ganoderma sp*.

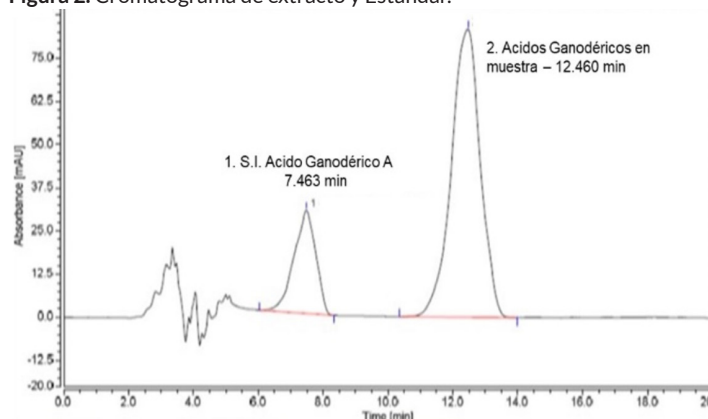


Fuente: Wilder Ramírez

Análisis cromatográfico

Con el método cromatográfico utilizado, se lograron aislar y detectar dos señales o picos principales (Figura 2). La primera de ellas corresponde al Ácido Ganodérico A, utilizado como estándar, con un tiempo de retención de 7,48 min, que fue confirmada con una corrida cromatográfica del estándar en forma aislada.

Figura 2. Cromatograma de extracto y Estándar.

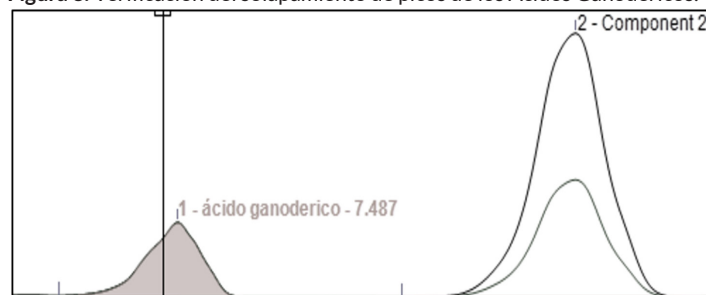


La segunda señal corresponde a los Ácidos Ganodéricos presentes en los extractos de las muestras, con un tiempo de retención de 12,45 min. Posterior a éste tiempo no se observan nuevas señales.

Se observa un solapamiento de picos o co-elución en la señal, que aparece de mayor tamaño. Las condiciones del método no fueron suficientes para obtener una mejor resolución y separar cada uno de los Ácidos Ganodéricos presentes en el extracto, posiblemente debido a la composición de la fase estacionaria de la columna cromatográfica.

A pesar de que no fue posible separar los Ácidos Ganodéricos presentes en el extracto, se corroboró su presencia, tomando el espectro UV-Vis del pico a 12,45 min y comparándolo con aquellos reportados en la bibliografía [32]. Con la ayuda del software del detector UV-Vis con arreglo de diodos, se pudo determinar también, el solapamiento de los picos en la señal. Tal como se observa en la Figura 3.

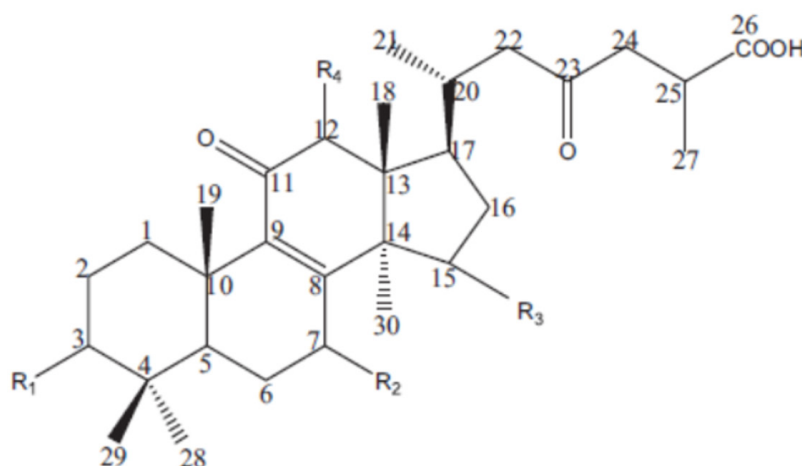
Figura 3. Verificación del solapamiento de picos de los Ácidos Ganodéricos.



Tanto los espectros y los tiempos de retención, indican que la señal producida se debe a los Ácidos Ganodéricos B y H. Estos ácidos tienen una gran semejanza estructural (son isómeros).

Liu *et al.* (2011), investigaron condiciones cromatográficas semejantes y encontraron que los Ácidos Ganodéricos B y H aparecieron en un pico superpuesto, probablemente por la determinación concomitante de los Ácidos Ganodéricos B y H; es decir, que la orientación espacial de los radicales o los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , tendrían una afinidad análoga por la fase estacionaria [29]. La figura 4 y el cuadro 1, presentan la similitud estructural de los ácidos Ganodéricos, tomando como base información científica actualizada.

Figura 4. Estructura química de los Ácidos Ganodéricos.



Tomado de: http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Ganoderma_lucidum.htm

Cuadro 1. Sustituyentes, presentes en los Ácidos Ganodéricos.

Ácido Ganodérico	R_1	R_2	R_3	R_4
A	= O	β -OH	α - OH	- H
B	β -OH	β -OH	= O	- H
H	β -OH	= O	= O	β - OAc

Tomado de: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/3786/1/Tesis%20Maximiliano%20Bidegain%20-%20corregida%20final.pdf>

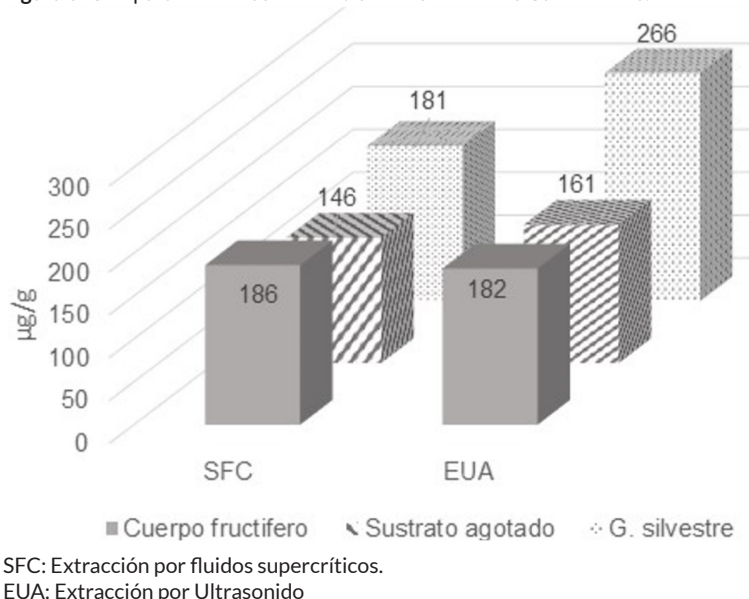
Cuantificación de los Ácidos Ganodéricos

El análisis cuantitativo de los extractos del sustrato agotado y *Ganoderma sp*, muestra que la técnica de extracción por ultrasonido (EUA) es más eficiente que la técnica de extracción por fluidos supercríticos (SFC), en cuanto a la concentración de Ácidos Ganodéricos obtenidos. En estos casos, las concentraciones fueron: 161,19 $\mu\text{g/g}$ para el sustrato agotado y 265,85 $\mu\text{g/g}$ para *Ganoderma silvestre* cuando se utilizó extracción con ultrasonido (EUA) y 146,66 $\mu\text{g/g}$ para el sustrato agotado y 181,52 $\mu\text{g/g}$ para *Ganoderma* cuando se utilizó extracción por fluidos supercríticos (SFC).

Para el caso de la extracción de Ácidos Ganodéricos a partir del cuerpo fructífero de la cepa comercial *Ganoderma lucidum*, se observan concentraciones similares en ambas técnicas de extracción, con 182,47 $\mu\text{g/g}$ utilizando EUA y 186,19 $\mu\text{g/g}$, utilizando SFC.

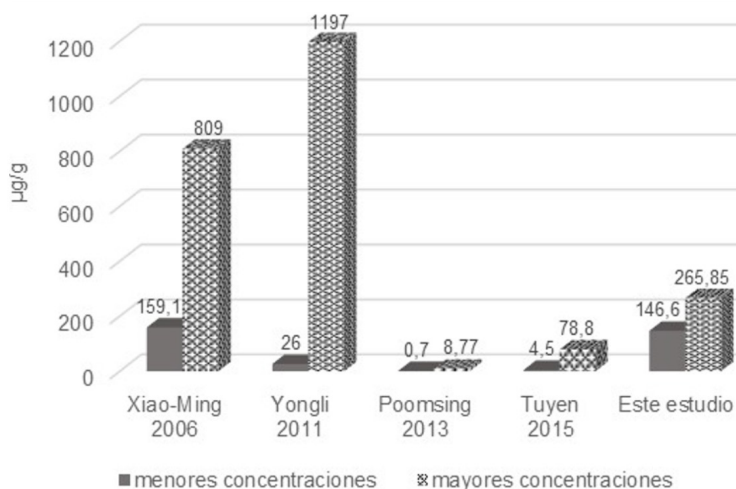
La mayor concentración de Ácidos Ganodéricos se presenta en los extractos de *Ganoderma sp*, seguida de *Ganoderma lucidum* comercial, independientemente del método de extracción empleado (Figura 5).

Figura 5. Comparación de las concentraciones de Ácidos Ganodéricos.



Los rangos de concentraciones de Ácidos Ganodéricos que se obtuvieron en ésta investigación (entre 266 y 147 µg/mL) se pueden comparar con los de otros autores [1, 15 29, 30]. De acuerdo a los mostrado en la figura 6, las concentraciones reportadas en éste estudio, varían o fluctúan entre los rangos reportados en otros artículos.

Figura 6. Ácidos Ganodéricos encontrados en éste estudio vs otras investigaciones.



La mayor concentración de Ácidos Ganodéricos, fue reportada por Nguyen y Yongli en 2011, con 1197 µg/mL pero cabe resaltar que fueron utilizadas las esporas para éste estudio y no el cuerpo fructífero [15]. De igual forma Xiao-Ming Wang *et al* (2006) [30] reportaron concentraciones de Ácidos Ganodéricos B y H en *Ganoderma lucidum*. Para el Acido Ganodérico B, desde 32 a 165 µg/mL y para el Ácido Ganodérico H desde 127,1 hasta 643,9 µg/mL, que para efectos prácticos fueron sumadas y aparecen en la gráfica 6 como una sola barra. Los resultados se obtuvieron de los extractos de cinco especies diferentes de *Ganoderma* originarias de China, usando etanol de 95%, un calentador de inmersión y concentrados por combinaciones de agua caliente, bases y ácidos

Los resultados de la figura 6 permiten dar una visión de la incidencia de los métodos de extracción, la parte del hongo a estudiar y la especie, sobre la concentración de Ácidos Ganodéricos que pueden ser obtenidos. Se observan diferencias muy significativas de concentraciones debido a los factores anteriormente nombrados.

CONCLUSIONES

En ésta investigación, se pudo comparar el efecto de dos métodos extracción sobre diferentes muestras de *Ganoderma*.

Adicionalmente se determinaron las condiciones cromatográficas, para la cuantificación rápida de Ácidos Ganodéricos (A.G.) presentes en las muestras. Las concentraciones de A.G encontradas. se ubicaron en los rangos publicados por otros autores

AGRADECIMIENTOS

Ricardo Soto, Docente del programa de Biología, MSc en Medio Ambiente. Por su ayuda en la recolección e identificación del *Ganoderma* sp

REFERENCIAS

- [1] POOMSING, P.; PATTANAPANYASAT, K.; WONGSINKONGMAN, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N. Research and Development of *Ganoderma lucidum* Cultivated in Thailand. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 3, 2013, p.1-7.
- [2] BABY, SABULAL; JOHNSON, ANIL-JOHN; GOVINDAN, BALAJI. Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, v. 114, 2015, p. 66-101.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>
- [3] BISHOP, KAREN; KAO, CHI-HSIU; XU, YUANYE; GLUCINA, MARCUS P.; PATERSON, RUSSELL R.; FERGUSON, LYNNETTE R. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, v. 114, 2015, p. 56-65.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.015>
- [4] TAOFIQ, OLUDEMI; HELENO, SADRINO; CALHELHA, RICARDO; ALVES, MARÍA-JOSÉ; BARROS, LILLIAM; GONZÁLEZ-PARAMÁS, ANA-MARÍA; BARREIRO, MARIA F.; FERREIRA, ISABELL. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food and Chemical Toxicology*, v. 108, n. A, 2017, p. 139-147.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.051>
- [5] TAOFIQ, OLUDEMI; GONZÁLEZ-PARAMÁS, ANA-MARIA; MARTINS, ANABELA; BARREIRO, MARIA-FILOMENA; FERREIRA, ISABELL. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. *Industrial Crops and Products*, v. 90, 2016, 38-48.
- [6] POSTEMSKY, PABLO; BIDEGAIN, MAXIMILIANO; GONZALEZ-MATUTE, RAMIRO; FIGLAS, N.D.; CUBITTO, M.A. Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, v. 231, 2017, p.85-93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- [7] BINGZHI, CHEN; BINRONG, K.E.; LIYUN, Y.E.; SHANSHAN, JIN; FAN, J.I.E. Isolation and varietal characterization of *Ganoderma resinaceum* from areas of *Ganoderma lucidum* production in China. *Scientia Horticulturae*, v. 224, 2017, p. 109-114.
- [8] POSTEMSKY, PABLO D.; MARINANGELI, PABLO A.; CURVETTO, NESTOR-RAÚL. Recycling of residual substrate from *Ganoderma lucidum* mushroom cultivation as biodegradable containers for horticultural seedlings. *Scientia Horticulturae*, v. 201, 2016, 329-327.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.021>

- [9] OZCARIZ-FARMOSELLE, MARIA-VIRGINIA; FRAILE-FABERO, RAÚL; GIRBÉS, JUAN- TOMAS; ARCE-CERVANTES, OSCAR; ORIA DE RUEDA-SALGUEIRO, JUAN-ANDRES; AZUL, ANABELA-MARISA. Use of lignocellulosic waste of pecan (*Carya illinoensis*) in the cultivation of *Ganoderma lucidum*. Revista Iberoamericana de Micología, v. 35, n. 2, 2018, p. 103-109.
- [10] XINGRONG, PENG; LEI, LI; JINRUN, DONG; SHUANGYANG, LU; JING, UL; XIAONIAN, LI; MINGHUA, QIU. Lanostane-type triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum*. Phytochemistry, v. 157, 2019, p. 103-110.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.011>
- [11] CHENLEI, LIAN; CUIFANF, WANG; QIN, XIAO; LEN, XIAO; YING, SU; JIEQUING, LU. The triterpenes and steroids from the fruiting body *Ganoderma duripora*. Biochemical Systematics and Ecology, v. 73, 2017, p.50-53.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.06.005>
- [12] XIAN-QIANG, CHEN; JING, ZHAO; LING-XIAO, CHEN; SHEN-FEI, WANG; YING, WANG; SHAO-PING, LI. Lanostane triterpenes from the mushroom *Ganoderma resinaceum* and their inhibitory activities against α -glucosidase. Phytochemistry, v. 149, 2018, p. 103-115.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.01.007>
- [13] ZHANG, JIANJUN; GUANGYUAN, MENG; ZHAI, GUOYIN; YANG, YONGHENG; ZHAO, HUAJIE; JIA, LE. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 82, 2016, p. 432-439.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.016>
- [14] SALGADO-ORDOSGOITIA, RODRIGO-DANIEL; ARIAS-MARTÍNEZ, JOHANNA-MILENA; ACOSTA-CHÁVEZ, AMPARO-DEL CRISTO; RODRÍGUEZ-MANRIQUE, JHONATAN-ANDRÉS; PÉREZ-PÉREZ, MARIO-FRANK. Chemical study of fraction ethyl acetate in the fungus *Ganoderma lucidum*, grown in agro-industrial waste. Revista de la academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, v. 40, n. 157, 2016, p. 600-607. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.391>
- [15] NGUYEN, M.T.; NGUYEN, T.M. Extraction of bioactive compounds and spore powder collection from *Ganoderma lucidum*. Can tho University Journal of Science, v. 1, 2015, p. 53-60.
- [16] SOOD, GUNJAN; SHARMA, SHIVANI; KHANNA, P.K.; KAPOOR, S. Optimization of extraction and characterization of polysaccharides from medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. Journal of Medicinal Plants research, v. 7, n. 31, 2013, p. 2323-2329.
<https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5115>
- [17] RUHAN-ASKIN, UZEL; UNAL-RIZA, YAMAN. A novel method for food particle production using subcritical water extraction: *Ganoderma mushroom* as a case example. The Journal of Supercritical Fluids, v. 111, 2016, p. 74-82.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.01.021>
- [18] LIAN, LI; HUI-JUN, GUO; LING-YANG, ZHU; LIMIN, ZHENG; XIN, LIU. A supercritical-CO₂ extract of *Ganoderma lucidum* spores inhibits cholangiocarcinoma cell migration by reversing the epithelial-mesenchymal transition. Phytomedicine, v. 23, 2016, p. 491-497. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.019>
- [19] JINWEI, LI; XINXIN, ZHANG; YUANFA, LIU. Supercritical carbon dioxide extraction of *Ganoderma lucidum* spore lipids. LWT-Food Science and Technology, v. 70, 2016, p. 16-23.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.019>
- [20] MEIRELES, A.; CARVALHO, RAÚL; MOURA, LUCINEWTON; ROSA, PAULO. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. The Journal of Supercritical Fluid, v. 35, 2005, p. 197-204.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.01.009>
- [21] QIAOZHEN, KANG; SISI, CHEN; SHUFANG, LI; BO, WANG; XIN, LIU; LIMIN, HAO; JIKE, LU. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. Internacional Journal of Biological Macromolecules, v. 124, 2019, p. 1137-1144.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.215>

- [22] ALZORQI, IBRAHIM; SINGH, AJIT; MANICKAM, SIVAKUMAR; AL-QRIMLI, F. Optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of β -D-glucan polysaccharides from *Ganoderma lucidum* for prospective scale-up. Resource efficient technologies, v. 3, 2017, p. 46-54.
<https://doi.org/10.1016/j.refit.2016.12.006>
- [23] AZUOLA, R.; VARGAS-AGUILAR, P. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Revista Tecnología en marcha, v. 20, 2007, p. 30-40.
- [24] RAMAKRISHNA, M.B; BADU, RAJESH.; VEENA, S.S; PANDEY, MEERA; RAO, NAGESWARA. Validated Reverse-Phase HPLC Method for Quantitative Determination of Ganoderic Acids A and B in Cultivated Strains of *Ganoderma* spp. (Agaricomycetes) Indigenous to India. International Journal of Medicinal, v. 19, 2017, p. 457-465.
- [25] LINGXIAO, CHEN; XIANQIANG, CHEN; SHENFEI, WANG; YAO, BIAN; JIN, ZHAO; SHAOPING, LI. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma resinaceum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry, v. 436, 2019, p.42-51.
<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.11.016>
- [26] LIU, WEI; ZHANG, JINGSONG; HAN, WEI; LIU, YANFANG; FENG, JIE; TANG, CHUANHONG; FENG, NA; TANG, QINGJIU. One single standar substance for the simultaneous determination of 17 triterpenes in *Ganoderma lingzhi* and its related species using high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, v. 1068-1069, 2017, p. 49-55.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.010>
- [27] TI-QIANG, CHEN; XIAO-YAN, ZHAO; JIN-ZHONG, WU; DE-YI, YU; YAN-BING, WU. Supercritical fluid CO₂ extraction, simultaneous determination of components in ultra-fine powder of *Ganoderma sinense* by HPLC-ESI-MS method. Journal of the Taiwan, v. 42, 2011, p. 428-434.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.08.003>
- [28] ZHAO, JING; XIAO-QI, ZHANG; SHAO-PING, LI; FENG-QING, YANG; YI-TAO, WANG; WEN-CAI, YE. Quality evaluation of *Ganoderma* through simultaneous determination of nine triterpenes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. Journal of Separation Science, v. 17, 2006, p. 2609-2615.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200600178>
- [29] LIU, YONGLI; LIU, YOUPIING; QIU, FENG; DI, XIN. Sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic Acids in *Ganoderma lucidum* and its related species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 54, 2011, p. 717-721.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.002>
- [30] XIAO-MING, WANG; MIN, YANG; SHU-HONG, GUAN; RONG-XIA, LIU; JIA-MENG, XIA; KAI-SHUN, BI; DE-AN, GUO. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis, v. 41, 2006, p. 838-844.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.053>
- [31] WEBER, ROLAND. Recent developments in the molecular taxonomy of fungi. The mycota XV: Physiology and Genetics: Select Basic and Applied Aspects. Springer Heidelberg, p. 1-15
- [32] SONIAMOL, JOSHEP; KAINOOR, JANARDHANAN; VARUGHESE, GEORGE; SABULAL, BABY. A new epoxidic ganoderic acid and other phytoconstituents from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry Letters, v. 4, n. 31, 2011, p. 386-398.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.08.011>

Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos*

Addition of *Lactobacillus plantarum* microencapsulated on intestinal, immune, productive parameters and bloody biochemistry in chickens

Adição de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado em parâmetros intestinais, imunes, produtivos e bioquímica sangrenta em frangos

JURADO-GÁMEZ, HENRY¹; ZAMBRANO-MORA, EDWARD²; FAJARDO-ARGOTI, CATALINA³

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 5 de Junio 2019.

Aprobado para publicación: 11 de Septiembre 2019.

* Proyecto de Investigación de origen: "Evaluación *In vivo* de la actividad probiótica de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre morfología intestinal, parámetros productivos, inmunológicos, y bioquímicos en pollo de engorde". Financiación: Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) Universidad de Nariño. Finalización: 2019.

- 1 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia, Grupo de Investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Forrajes y Apicultura (PROBIOTEC-FORAPIS). Ph.D en Ingeniería con Énfasis en Ingeniería de Alimentos. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2118-7997>
- 2 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento Salud Animal, Programa Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Forrajes y Apicultura (PROBIOTEC-FORAPIS). M.Sc. Ciencias Agrarias. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8443-2243>
- 3 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia, Grupo de Investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Forrajes y Apicultura (PROBIOTEC-FORAPIS). M.Sc (c) en Producción Animal. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1993-6573>

Correspondencia: henryjugam@gmail.com

RESUMEN

El sector avícola presenta problemas sanitarios que disminuyen su productividad, por ello el objetivo fue evaluar el efecto de *L. plantarum* microencapsulado en pollo de engorde. Se valoraron las características del microencapsulado (viabilidad, eficiencia y variables físicas), los parámetros productivos (consumo de materia seca, ganancia de peso y conversión alimenticia), bioquímicos (colesterol, triglicéridos y proteínas totales) e histopatológicos en aves sometidas a cuatro tratamientos; dos testigos (sin probiótico y probiótico comercial) y dos con suministro de *L. plantarum* (con y sin microencapsular). Los resultados demostraron que la cepa tiene un crecimiento adecuado a diferentes condiciones gastrointestinales in vitro, que le da ventajas para atravesar el tracto gastrointestinal. Por otra parte, los resultados para el estudio in vivo demostró que el suministro de la bacteria láctica tienen efectos positivos sobre los parámetros productivos, aunque no se realizó una comparación con otros estudios debido a las condiciones particulares de la investigación. Se observó un incremento de los niveles de colesterol y triglicéridos con el suministro de la cepa probiótica, al igual que un incremento de las lesiones histopatológicas. *L. plantarum* microencapsulado tiene potencial como aditivo probiótico en el sector avícola, aunque debe mejorarse la investigación en la cantidad de inóculo a suministrar.

ABSTRACT

The poultry sector has health problems that decrease its productivity, so the objective was to evaluate the effect of microencapsulated *L. plantarum* in broilers. The characteristics of the microencapsulation (viability, efficiency and physical variables), the productive parameters (dry matter consumption, weight gain and food conversion), biochemicals (cholesterol, triglycerides and total proteins) and histopathological in birds undergoing four treatments were evaluated; two witnesses (without commercial probiotic and probiotic) and two with supply of *L. plantarum* (with and without microencapsular). The results showed that the strain has adequate growth to different gastrointestinal conditions in vitro, which gives it advantages to cross the gastrointestinal tract. On the other hand, the results for the in vivo study showed that the supply of lactic bacteria have positive effects on the productive parameters, although no comparison was made with other studies due to the particular conditions of the investigation. An increase in cholesterol and triglyceride levels was observed with the supply of the probiotic strain, as well as an increase in histopathological lesions. Microencapsulated *L. plantarum* has potential as a probiotic additive in the poultry sector, although research on the amount of inoculum to be supplied should be improved

PALABRAS CLAVE:

BAL; Broiler; In vivo; Probiótico; *Lactobacillus plantarum*.

KEYWORDS:

LAB; Broiler; In vivo; Probiotic; *Lactobacillus plantarum*.

PALAVRAS CHAVE:

BAL; Frangos de corte; In vivo; Probiótico; *Lactobacillus plantarum*.

Cómo citar este artículo: JURADO-GÁMEZ, HENRY; ZAMBRANO-MORA, EDWARD; FAJARDO-ARGOTI, CATALINA. Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 217-229. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)217-229](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)217-229)

RESUMO

O setor avícola apresenta problemas de saúde que diminuem sua produtividade, portanto, o objetivo foi avaliar o efeito de L. plantarum microencapsulado em frangos de corte. Foram avaliadas as características da microencapsulação (viabilidade, eficiência e variáveis físicas), parâmetros produtivos (consumo de matéria seca, ganho de peso e conversão alimentar), bioquímicos (colesterol, triglicerídeos e proteínas totais) e histopatológicos em aves submetidas a quatro tratamentos; duas testemunhas (sem probiótico comercial e probiótico) e duas com suprimento de L. plantarum (com e sem microencapsular). Os resultados mostraram que a cepa tem crescimento adequado para diferentes condições gastrointestinais in vitro, o que oferece vantagens para atravessar o trato gastrointestinal. Por outro lado, os resultados do estudo in vivo mostraram que o suprimento de bactérias lácticas tem efeitos positivos nos parâmetros produtivos, embora nenhuma comparação tenha sido feita com outros estudos devido às condições particulares da investigação. Foi observado um aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos com o suprimento da cepa probiótica, bem como um aumento nas lesões histopatológicas. L. plantarum microencapsulado tem potencial como aditivo probiótico no setor avícola, embora a pesquisa sobre a quantidade de inóculo a ser fornecido deva ser melhorada

INTRODUCCIÓN

El sector avícola ha tenido un creciente avance, gracias a la acción conjunta de genética, nutrición, sanidad y manejo [1]. Sin embargo, la presión de los mercados por una mayor demanda de este producto, genera la búsqueda de animales con un crecimiento rápido y con una mayor calidad de carne [2]. Esto crea inconvenientes en el manejo de grandes poblaciones, especialmente la parte sanitaria, que hace uso intensivo de los antibióticos promotores de crecimiento como medios para controlar la proliferación de microorganismos patógenos [3].

La introducción de promotores de crecimiento (APC-antibióticos en dosis subterapéuticas) en la alimentación animal no sólo influye en las poblaciones microbianas intestinales y sus actividades, sino que además, afectan el metabolismo del animal y alteran específicamente la función intestinal [4-6]. Junto a lo anterior, el uso indiscriminado de los antibióticos ha producido graves problemas sobre el control de las enfermedades de origen bacteriano, ya que en los últimos años se ha incrementado la aparición de microorganismos resistentes, que dificulta su manejo sanitario en humanos y animales [7].

Como respuesta a este problema, la investigación ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas alternativas que promuevan una producción más limpia, sin el uso de aditivos que pongan en riesgo la salud humana y animal [8]. Esto incluye mejorar las normas de bioseguridad y manejo en las producciones avícolas, aplicando un programa de vacunación, haciendo selección genética y realizando la búsqueda, desarrollo y utilización de nuevos aditivos nutricionales como los probióticos, prebióticos, oligosacáridos, ácidos orgánicos, entre otros [9]. Estos aditivos permiten el control del establecimiento de una microbiota benéfica en los animales, además de la disminución paulatina de enteropatógenos, mejorando la producción animal y disminuyendo el riesgo para la salud humana [10-12].

Estudios realizados recientemente han demostrado que las bacterias ácido lácticas muestran características adecuadas para el control de estos microorganismos patógenos [13], sin embargo, la verificación y evaluación de estos microorganismos debe ser rigurosa con el fin de encontrar información adecuada y pertinente para los fines que se propone su utilización [14].

En respuesta a lo anterior, los organismos probióticos se han microencapsulado con el fin de aumentar la supervivencia a través del tracto gastrointestinal y con ello, garantizar una mejor colonización del organismo huésped [15], esperando que mejore la viabilidad de *L. plantarum* como agente probiótico y permita mejorar los parámetros productivos del pollo de engorde.

Por lo anterior, la investigación busca determinar el efecto del suministro de *L. plantarum* microencapsulado sobre los parámetros productivos, la respuesta inmune y la bioquímica sanguínea del pollo de engorde.

MÉTODO

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio PROBIOTEC FORAPIS de la Universidad de Nariño ubicada en la ciudad de Pasto a una altura de 2600 msnm, 14°C y una humedad relativa del 65%.

Cepa y condición de cultivo

Las condiciones para *L. plantarum* se tomaron de Orbes *et al.* [16], quienes encontraron la fase exponencial a las 14 horas con un crecimiento de $6,6 \times 10^8$ UFC/150 mL en medio MRS. En esta investigación se usó *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, la cual se reconstituyó de acuerdo con la casa comercial.

Después de 24 h de la reconstitución, se confirmó el crecimiento y desarrollo para luego repicar con asa de argolla por el método de estrías en cajas de agar MRS comercial con azul de anilina, e incubar por 24 horas a 37°C. Todos los procedimientos de manejo de la cepa se realizaron en cámara de flujo laminar tipo II. Se evaluó la morfología macroscópica y microscópicamente con el uso de la coloración de Gram, procedimiento que fue realizado cada 15 días para verificar la viabilidad de la cepa.

Cultivo del inóculo de *Lactobacillus plantarum*

Se inoculó una asada del cultivo en un Erlenmeyer que contenía 40 mL de caldo MRS comercial estéril. Se incubó por 24 horas a 37°C. Nuevamente se realizó un repique de 4 mL de este caldo a otros 40 mL de caldo MRS comercial y se incubó en las condiciones antes mencionadas.

Para realizar el ajuste se tomó lo descrito en Jurado-Gómez *et al.* [17] quienes tomaron en cuenta un valor de 10% v/v para el inicio de la fermentación. Después, se calculó el número de bacterias por mL. Del caldo MRS con el inóculo se tomó 1 mL y se vertió en 9 mL de solución de agua peptonada, cuando se presentó mayor población de la establecida, se adicionó caldo estéril de la siguiente manera:

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar.

M_2 = 0,125 densidad óptica equivalente a $1,50 \times 10^8$ bacteria/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

V_1 = 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90).

X_1 = cantidad que contiene M_2 .

V_2 = lo que se agrega a 1 mL para ajustar a $1,50 \times 10^8$ bacterias/mL.

V_3 = 100 mL cantidad total del inóculo

X_2 = cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población el valor de M_2 .

Se halla X_1 :

$$\begin{array}{l} M_1 \text{ ----- } M_2 \\ M_2 \text{ ----- } X_1 \end{array}$$

$$X_1 = \frac{M_2 * V_1}{M_1} \quad (\text{Ec. 1})$$

Ahora se encuentra V_2 :

$$V_2 = V_1 - X_1 \quad (\text{Ec. 2})$$

Finalmente, se obtiene el valor de X_2

$$\frac{V_1 - V_2}{V_3 - X_2} = \frac{V_3 * V_2}{V_1} \quad (\text{Ec. 3})$$

El valor de X_2 , es la cantidad que se debe agregar para ajustar la población.

Microencapsulación

Obtención de biomasa microbiana. La cepa se conservó en crioviales (con glicerol al 1%) a una temperatura de -20°C . Para su uso, se activó mediante incubación a 37°C en caldo MRS por 24 h en condiciones aerobias. En cada caso, la biomasa al final de la fase exponencial se recuperó por centrifugación (5000 rpm) a 4°C y el sobrenadante se descartó. Finalmente, las células fueron lavadas con una solución estéril de NaCl al 0,85% p/v y conservadas en refrigeración ($6 \pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta su uso.

Encapsulación de *L. plantarum*. Para este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología descrita por Rodríguez *et al.* [21]. Se preparó un inóculo con 400 mL al 15% p/v de *L. plantarum* (60 g de Maltodextrina y 60 g de Inulina en 280 mL de inóculo bacteriano previamente ajustado) en relación 1:1 p/p, que fue agitado hasta homogenizar.

Se utilizó el equipo de secado por aspersión (Secador Spray Bilon 6000s®), con una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida entre 65 y 67°C con ciclo completo de 2 h y 30 min. El material microencapsulado se empacó en recipientes plásticos oscuros estériles y se almacenaron a temperatura ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para su posterior utilización.

Estudio del microencapsulado. La cepa microencapsulada se evaluó en viabilidad, eficiencia y las características físicas: humedad, actividad de agua, solubilidad y humectabilidad [18]. De igual manera, se evaluaron las características estructurales, morfología y tamaño del microencapsulado. Finalmente, se evaluó la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas de acuerdo con Coppola y Gil [19]: pH 3, concentraciones de 0,1 (Ta) y 0,3% (Tb) de bilis; y concentraciones de 0,5 (Ta) y 1% (Tb) de sales biliares, más un testigo (Tc) para ambos tratamientos.

Inoculación del alimento balanceado. Una vez establecida la carga microbiana mediante el ajuste del inóculo, la bacteria ácido láctica se adicionó por aspersión a una concentración de 20% p/v, para luego realizar el mezclado y finalmente se incubó a 37°C por 24 h [16]. Al final, se conservó a temperatura ambiente y en bolsas de cierre hermético.

Evaluación en pollos de engorde

Se utilizaron 300 pollos machos de un día de edad (Ross 308 AP). Los animales se alojaron en jaulas de la clínica veterinaria Carlos Martínez Hoyos perteneciente a la Universidad de Nariño. Los pollos se mantuvieron a una temperatura de 30°C , que disminuyó a 21°C al final del experimento. La humedad estuvo entre 50 y 65%. Durante los primeros 7 días, los pollos tuvieron luz las 24 h, para luego ir disminuyendo gradualmente hasta 12 h. El

experimento se realizó de los 7 a los 35 días. La primera semana fue de adaptación a las raciones experimentales, con un suministro de agua *ad libitum*.

Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en cuatro grupos de 60 aves cada uno. El primer grupo fue alimentado con una dieta comercial sin aditivos (T0); el segundo, dieta comercial con probiótico comercial (T1, consorcio); el tercero, dieta comercial con *Lactobacillus plantarum* microencapsulado (T2) y el cuarto, dieta comercial con *Lactobacillus plantarum* sin microencapsular (T3). Las aves fueron alimentadas dos veces al día, de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial.

Se midió el consumo de materia seca (CMS), la ganancia de peso (GP) y la conversión alimenticia (CA). De igual manera, se determinaron los metabolitos sanguíneos, triglicéridos y colesterol mediante los protocolos establecidos por los kit de Biositem® y proteínas totales mediante refractómetro.

Al final del periodo experimental se sacrificaron 10 aves por grupo y se tomaron muestras del tracto gastrointestinal, que se colocaron en formol buferado al 10% para fijación por 24 h, luego se hizo corte de duodeno, yeyuno e ileon y se colocaron en cassettes para inclusión de tejidos debidamente rotulados, se les realizó inclusión en parafina y coloración de hematoxilina y eosina. En los micropreparados se establecieron los parámetros histológicos hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales.

La tinción diferencial utilizada en el estudio fue la coloración con Alcian Blue, que fue ajustada a un pH de 2,5 a 3,0. Para determinar la cantidad de moco producido por las células caliciformes, las áreas se estimaron entre la capa más interna de mucosa y la más externa de la misma, de 5 campos intestinales diferentes en cada animal, se usó como lectura en objetivo de 40X usando un microscopio Nikon Eclipse 80i, camera infinity y el software ImagePro Plus 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para la descripción de alteraciones microscópicas a Jubb *et al.* [20].

Para establecer la relación cripta-vellosidad en el intestino delgado, la longitud de la vellosidad se calculó midiendo la distancia entre la punta de la vellosidad y su base, excluyendo la cripta. Este procedimiento se hizo en cada uno de los grupos experimentales.

Para histoquímica se emplearon marcadores monoclonales inmunohistoquímicos de uso en humanos CD3 y CD79a a los bloques de parafina del tracto gastrointestinal de los animales para evaluar la expresión de linfocitos T y B del tejido linfóide asociado al intestino GALT.

Microscopia electrónica de barrido. Las muestras del segmento conservado en alcohol al 90° se analizaron mediante la técnica del Laboratorio de Microscopia electrónica de la Universidad de Caldas, utilizando el protocolo para el procesamiento de este tipo de muestras definido por dicho Laboratorio. También, se tomó registro fotográfico para evidenciar el resultado.

Análisis estadístico

En todas las variables se determinó estadística descriptiva. El crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis se evaluó mediante un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos: Ta 0,3% de sales biliares, Tb 0,5% de sales biliares y Tc crecimiento sin sales biliares (testigo), cada tratamiento contó con 8 réplicas. Para la variable bilis, se usó el mismo diseño y número de réplicas por tratamiento (Ta: bilis al 0,3%, Tb con bilis al 0,5% y Tc sin bilis).

Los parámetros zootécnicos (CMS, GP y CA) y bioquímicos (triglicéridos, colesterol y proteínas totales) se evaluaron mediante un diseño completamente al azar con 4 tratamientos (60 aves cada uno), 3 repeticiones por tratamiento (20 aves por repetición) y se muestreó de manera aleatoria a 5 animales por réplica para un total de 15 animales muestreados por tratamiento. Se determinó diferencias mediante la prueba paramétrica Tukey a un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS

Los resultados de la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* se pueden observar en el cuadro 1. Los valores indican una buena viabilidad del microencapsulado; al respecto, Rodríguez *et al.* [18] encontraron porcentajes de 84 y 96% de viabilidad para *L. rhamnosus* y *L. casei* respectivamente. Por otra parte, Montes [21] tuvo una viabilidad de 46,53% para *L. casei*, valor más bajo al encontrado en esta investigación.

La eficiencia se encuentra por debajo de lo reportado por Chen *et al.* [22] con valores entre 96,5 y 97,85%. Sin embargo, Parra [23] indica que este parámetro se ve influenciado por factores como la masa molecular del polímero, tamaño y microporosidad de la esfera y características físico-químicas del principio activo, factores que podrían explicar los resultados obtenidos.

Para el caso de la humedad, el valor encontrado es mayor al de otros autores [24-25], lo que demuestra que es necesario trabajar más sobre este parámetro. Al respecto, Dinkçi *et al.* [26] mencionan que la humedad en un microencapsulado debe mantenerse entre 3,5 y 4,0%, ya que puede presentar problemas de conservación durante su vida útil.

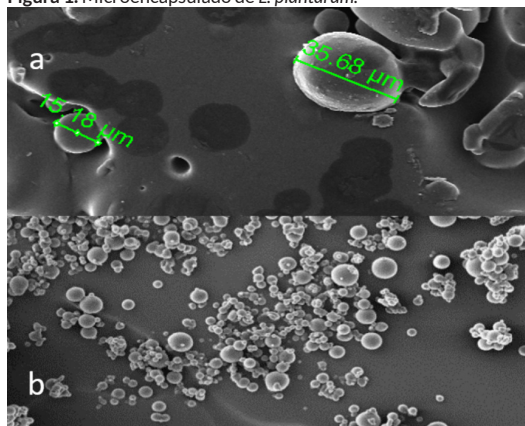
La humectabilidad tiene un menor tiempo, en comparación al estudio de Montes [21]; este autor menciona que la lenta rehidratación tiene un efecto positivo sobre la viabilidad de las cepas microencapsuladas, lo que sugeriría que se necesita mejorar su textura con otros materiales microencapsulantes.

El tamaño y la morfología se observan en las figuras 1. En cuanto al tamaño de partícula se encontraron valores de 15,18 a 35,68 μm . Los estudios muestran que el tamaño del microencapsulado influye sobre la viabilidad de la bacteria [27]. Ramos *et al.* [27] manifiesta que tamaños entre los 2 y 100 μm se consideran adecuados para una microencapsulación, ya que si son demasiados grandes dificulta la liberación de la cepa y si son muy pequeños,

Cuadro 1. Parámetros del microencapsulado de *Lactobacillus plantarum*.

Factor	Valor
Viabilidad	83,3%
Eficiencia	88,4%
Humedad relativa	7,79%
Actividad de agua	0,4
Humectabilidad	1:56 min
Solubilidad	96%

Figura 1. Microencapsulado de *L. plantarum*.



A: tamaño, b: morfología.

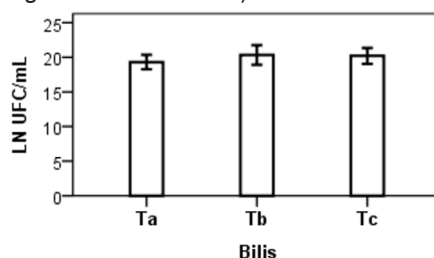
su protección no será efectiva. Por ello, los resultados encontrados tienen un efecto positivo sobre la microencapsulación de *L. plantarum*.

Para la simulación de condiciones gastrointestinales, el crecimiento, a pH 3 por 24 h, mostró un crecimiento de $6,4 \times 10^9$, valor indicador de que la cepa láctica muestra resistencia a las condiciones ácidas; si se tiene en cuenta que el pH gastrointestinal de las aves puede llegar hasta 3 o incluso menos, la bacteria tiene altas posibilidades de sobrevivir microencapsulada y con ello atravesar la porción inicial de tracto digestivo [28].

Para el caso de bilis y sales biliares los resultados se pueden observar en la figura 2. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). Esto demuestra que el crecimiento en condiciones gastrointestinales simuladas no se ve afectado. Al respecto, estudios realizados por Chen *et al.* [29] indican que las bacterias ácido lácticas microencapsuladas presentan mejor crecimiento en condiciones de pH alto (básico), debido a la capa protectora que las recubre, de esta manera se garantiza la viabilidad de la cepa, para su posterior liberación en un ambiente menos agresivo.

Los resultados de los parámetros productivos se puede observar en el cuadro 2, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) y se observa un mayor crecimiento en los tratamientos probióticos comercial y *L. plantarum* sin microencapsular.

Figura 2. Análisis de bilis y sales biliares.



Cuadro 2. Parámetros productivos, bioquímicos, microbiológicos, e histológicos.

Parámetros productivos				
Variable	T0	T1	T2	T3
GP (g)	181,17± 23 ^b	240,34 30± ^a	190,68± ^b	276,39± 32 ^a
Consumo (g)	4403,0± 58 ^b	4313,3± 59 ^b	4548,0± 34 ^a	4773,7± 59 ^a
CA	4,39± 0,3 ^b	3,21± 0,1 ^c	5,42± 0,2 ^a	4,13± 0,4 ^b
Parámetros bioquímicos				
Variable	T0	T1	T2	T3
Colesterol (mg/dL)	158,8± 1,2 ^b	161,5± 2,1 ^c	202,8± 3 ^a	164,4± 1,4 ^b
Trigliceridos (mg/dL)	116,0± 4,7 ^b	115,2± 6,2 ^b	92,2± 7,2 ^c	151,0± 6,3 ^a
Proteína total (g/dL)	3,48± 0,9 ^a	3,63± 0,6 ^a	3,80± 0,7 ^a	3,50± 0,6 ^a
Parámetros microbiológicos				
Variable	T0	T1	T2	T3
Lactobacillus	95000	284000	112800	200500
E. coli	0	0	0	0
Coliformes	666,7	55666,7	500	0
Conteo en tinciones				
Variable	T0	T1	T2	T3
Histoquímica	367	340	280	342
Caliciformes	1476	1002	1356	1290

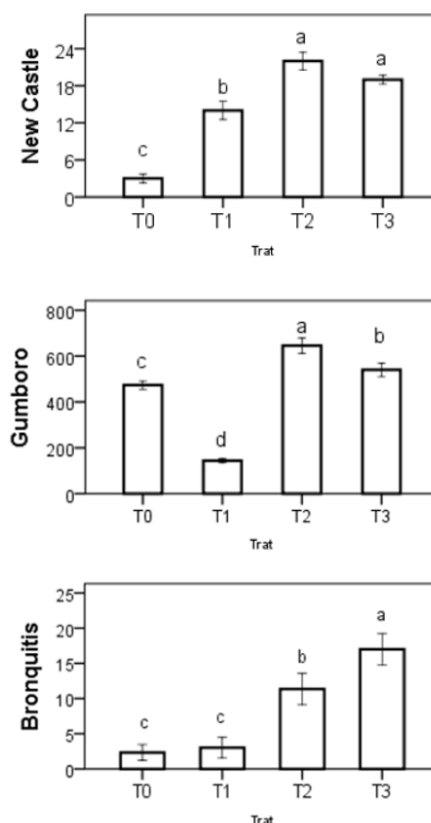
Estos resultados indican que el suministro de probióticos en la alimentación de pollos de engorde muestra ser benéfico para los rendimientos productivos. En cuanto al consumo, se encontraron resultados similares y la conversión alimenticia muestra como el tratamiento con probiótico comercial (T2) tienen mayor eficiencia en la transformación del alimento.

A pesar de observarse diferencias entre los parámetros bioquímicos, los valores se encuentran dentro del rango normal de la especie, por lo que no se puede tener información concluyente sobre los efectos de los organismos probióticos sobre los parámetros bioquímicos evaluados.

Como era de esperarse, los parámetros microbiológicos demostraron un incremento de la población microbiana en los tratamientos con el suministro de probióticos, ya sea en consorcio (probiótico comercial) como cepas individuales (*L. plantarum*). Al respecto, Manes-Lazaro *et al.* [30] mencionan que la presencia de organismos probióticos en el tracto gastrointestinal de las aves tiene un efecto benéfico para su salud. Entre estos beneficios se encuentra la exclusión competitiva, el antagonismo hacia otras cepas, especialmente patógenas la estimulación inmune del hospedero y producción de biocinas [31]. Con lo anterior, se puede determinar que algunas de las mejoras en los parámetros zootécnicos pueden ser el resultado de la correcta colonización de los probióticos en el tracto de los pollos de engorde evaluados.

Los resultados para títulos se observan en las figuras 3. Se encontró una mayor seroconversión para los tratamientos con administración de *L. plantarum* (T2 y T3), lo que demuestra un efecto positivo de la bacteria. En el caso de Gumboro y bronquitis muestran resultados similares, ya que T2 y T3 presentan los mayores valores de seroconversión.

Figura 3. Títulos inmunológicos para New Castle, Gumboro y Bronquitis.



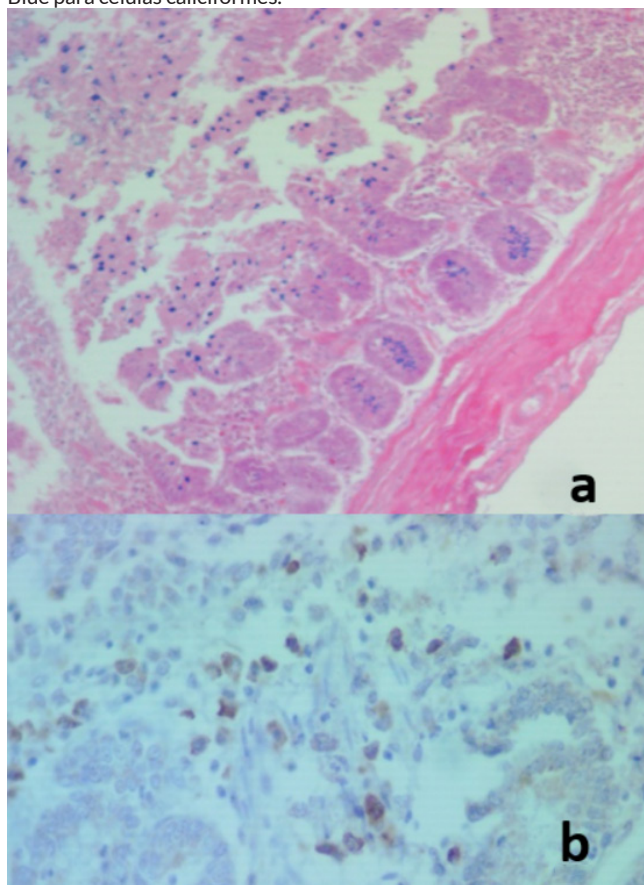
Los resultados demuestran que es una ventaja la utilización de *L. plantarum* en la estimulación del sistema inmunitario de los pollos de engorde; factor que tendrá efectos benéficos para el sistema de producción.

En otros estudios se ha demostrado que la utilización de cepas probióticas permite la estimulación del sistema inmunológico del animal huésped, estos efectos se han observado en aves y cerdos, lo que corrobora los resultados obtenidos. Sin embargo, se necesita continuar con la investigación, ya que este tipo de resultados aún no son concluyentes para la comunidad científica y se hace necesario realizar otro tipo de pruebas para determinar su efectividad [32-33].

Los resultados para coloración e histoquímica de células caliciformes se pueden observar en la figura 4 y cuadro 2. Se encontró que las células caliciformes fueron marcadas con la técnica Alcian blue y con ello se puede realizar conteo de estas. De igual manera, la inmunomarcación fue positiva para los tejidos de pollos de engorde, lo que se convierte en una herramienta más para investigar los efectos probióticos en este tipo de animales.

Se observa que los mayores valores para ambas variables se pueden observar en el tratamiento T0 (sin probiótico). Estos resultados no se pueden explicar de manera adecuada, dado que se esperaría que los tejidos de animales con administración de probióticos debieran tener el mayor conteo, sin embargo, dado que la técnica recién inicia en la identificación de células de pollo de engorde, se hace necesario continuar investigando para obtener información más contundente.

Figura 4. Inmunohistoquímica en intestino delgado coloración de Alcian Blue para células caliciformes.



a: Tinción de Alcian blue para caliciformes; b: inmunohistoquímica.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la administración de *Lactobacillus plantarum* tiene efectos positivos sobre los parámetros productivos ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Aunque el suministro muestra diferencias en los parámetros bioquímicos, estos valores están dentro del rango para la especie. De igual manera, se incrementan la respuesta inmune del hospedero. Finalmente, el método de microencapsulado y la matriz usada para recubrir la cepa mantiene la viabilidad de la bacteria.

REFERENCIAS

- [1] NKUKWANA, T. Global poultry production: Current impact and future outlook on the South African poultry industry. *South African Journal of Animal Science*, v. 48, n. 5, 2018, p. 869-884.
10.4314 / sajas.v48i5.7
- [2] SELL-KUBIAK, EWA; WIMMERS, KLAUS; REYER, HENRY; SZWACZKOWSKI, TOMASZ. Genetic aspects of feed efficiency and reduction of environmental footprint in broilers: a review. *Journal of applied genetics*, v. 58, n. 4, 2017, p. 487-498.
10.1007/s13353-017-0392-7
- [3] GAO, PENGFEI; MA, CHEN; SUN, ZHENG; WANG, LIFENG; HUANG, SHI; SU, XIAQUAN; ZHANG, HE-PING. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, v. 5, n. 1, p. 91.
<http://10.1186/s40168-017-0315-1>
- [4] AGUNOS, AGENES; LÉGER, DAVID F.; CARSON, CAROLEE A.; GOW, SHERYL P.; BOSMAN, ANGELINA; IRWIN, REBECCA J.; REID-SMITH, RICHARD J. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. *PloS one*, v. 12, n. 6, 2017, p. e0179384.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179384>
- [5] COYNE, LUC; ARIEF, RIANA; BENIGNO, CAROLYN; GIANG, VO-NGAN; HUONG, LUU-QUYNH, JEAMSRI-PONG, SAHARUETAI; KALPRAVIDH, WANTANEE; MCGRANE, JAMES; PADUNGTO, PAWIN; PATRICK, IAN; SCHOONMAN, LUUK; SETYAWAN, ERY; SUKARNO, ADY-HARJA; SRISAMRAN, JUTANAT; NGOC, PHAM-THI; RUSHTON, JONATHAN. Characterizing Antimicrobial Use in the Livestock Sector in Three South East Asian Countries (Indonesia, Thailand, and Vietnam). *Antibiotics*, v. 8, n. 1, 2019, p. 33-45.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8010033>
- [6] WU, ZINPING. Antimicrobial use in food animal production: situation analysis and contributing factors. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, v. 5, n. 3, 2018, p. 301-311.
<https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018207>
- [7] HANG- PHAM, THI-THU; ROSSI, PIERRE; KHOA-DINH, HOANG-DANG; ANH-PHAM, NGOC-TU; ANH-TRAN, PHUONG; MUI-HO, OTHI-KHAI; TUC-DINH, QUOC; DE ALENCASTRO, LUIZ-FELIPPE. Analysis of antibiotic multi-resistant bacteria and resistance genes in the effluent of an intensive shrimp farm (Long An, Vietnam). *Journal of environmental management*, v. 214, 2018, p. 149-156.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.089>
- [8] GADDE, W.; KIM, W.; ILLEHOJ, HYUN S. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, v. 18, n. 1, 2018, p. 26-45.
<https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- [9] PLOEGMAKERS, I.B.; OLDE-DAMINK, S.W.; BREUKINK, S.O. Alternatives to antibiotics for prevention of surgical infection. *British Journal of Surgery*, v. 104, n. 2, 2017, p. e24-e33.
<https://doi.org/10.1002/bjs.10426>
- [10] FORD, ALEXANDER C.; HARRIS, LUCINDA, A.; LACY, BRIAN E.; QUIGLEY, EAMONN M.; MOAYYEDI, PAUL. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, symbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 48, n. 10, 2018, p. 1044-1060.
<https://doi.org/10.1111/apt.15001>

- [11] MARKOWIAK, PAULINA; ŚLIŻEWSKA, KATARZYNA. The role of probiotics, prebiotics and symbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*, v. 10, n. 1, 2018, p. 21-38.
<http://10.1186/s13099-018-0250-0>
- [12] DOWARAH, RUNJUN; VERMA, A.K.; AGARWAL, NEETA. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition*, v. 3, n. 1, 2017, p. 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.002>
- [13] WANG, YONGWEI; DONG, ZHENGLIN; SONG, DAN; ZHOU, HANG; WANG, WEIWEI; MIAO, HAIJIANG; LI, AIKE; LI, WANG. Effects of microencapsulated probiotics and prebiotics on growth performance, antioxidative abilities, immune functions, and caecal microflora in broiler chickens. *Food and agricultural immunology*, v. 29, n. 1, 2018, p. 859-869.
<https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1463972>
- [14] BYAKIKA, STELLAH; MUKISA, IVAN-MUZIRA; BYARUHANGA, YUSUF-BYENKYA; MUYANJA, CHARLES. review of criteria and methods for evaluating the probiotic potential of microorganisms. *Food Reviews International*, v. 5, n. 2, 2019, p. 1-40.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815>
- [15] GADDE, U; KIM, W.H.; OH, S.T; LILLEHOJ, HYUN. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, v. 18, n. 1, 2017, p. 26-45.
<https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- [16] JURADO-GÁMEZ, HENRY; ORBES-VILLACORTE, ADRIANA-ELIZABETH; MESÍAS-PANTOJA, LAURA-NATHALY. Evaluation in vivo of *Lactobacillus plantarum* with probiotic characteristics by blood chemistry, immunohisto química and electron microscopy in *Cavia porcellus*. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 15, n. 2, 2017, p. 11-21.
[http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)11-21](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)11-21)
- [17] JURADO-GÁMEZ, HENRY; JARRÍN-JARRÍN, VERONICA; BUSTAMANTE-MELO, JESÚS. Efecto bioconservante del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* en lomo de cerdo (*Longissimus dorsi*). *Revista de Medicina Veterinaria*, v. 35, 2017 p. 159-173.
<http://dx.doi.org/10.19052/mv.4399>
- [18] RODRÍGUEZ, H; JIMENEZ, T. La microencapsulación. *Revista veterinaria del Perú*, v. 34, n. 2, 2018, p. 34-41.
- [19] COPPOLA-MENEZES, MARIO; GIL-TURNES, CARLOS. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, 2004, p. 1297-1303.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400056>
- [20] JUBB, K.; KENNEDY, PETER; PALMER, NIGER. *Pathology of Domestic Animals*. 6 ed. Washington (USA): Elsevier, Inc. 2016. 670 p.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2823-6.X5001-5>
- [21] MONTES, LUZ; RODRÍGUEZ-BARONA, SNEYDER; GIRALDO, GLORIA. Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica*, v. 27, n. 6, 2010, p. 135-144.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>
- [22] CHEN, HAIYAN; LI, XIANGYI; LIU, BIENGJIE; MENG, XIANHONG. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, v. 29, 2017, p. 248-255.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.015>
- [23] PARRA-HUERTAS, RICARDO-ADOLFO. Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, v. 63, n. 2, 2010, p. 5669-5684.
- [24] SAMEDI, LESLY; CHARLES, ALBERT-LINTON. Viability of 4 probiotic bacteria microencapsulated with arrowroot starch in the simulated Gastrointestinal Tract (GIT) and yoghurt. *Foods*, v. 8, n. 5, 2019, p. 175-183.
<https://doi.org/10.3390/foods8050175>
- [25] LIAO, LIANGKUN; XIAOYI,WEI; GONG, XIAO; LI, JIHUA; HUANG, TAO; XIONG, TAO. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and *in vitro* digestion. *LWT-food science and technology*, v. 82, 2017, p. 82-89.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>

- [26] DINKÇI, NAYIL; AKDENIZ, VILDAL; AKALIN, SIBEL A. Survival of probiotics in functional foods during shelf life. *Food Quality and Shelf Life*, v. 201, 2019, p. 345-350.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00006-9>
- [27] RAMOS, PHILIPPE E.; CERQUEIRA, MIGUEL A.; TEIXEIRA, JOSÉ A.; VICENTE, ANTONIO A. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 58, n. 11, 2018, p. 1864-1877.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1289148>
- [28] MABELEBELE, M; NORRIS, D.; BROWN, D; GININDZA, M.M.; NGAMBI, J.W. Breed and sex differences in the gross anatomy, digesta pH and histomorphology of the gastrointestinal tract of *Gallus gallus domesticus*. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 19, n. 2, 2017, p. 339-346.
<https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0275>
- [29] MIN-JU, CHEN; HSINYU, TANG; MING-LUNG, CHIANG. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefirifaciens* M1. *Food microbiology*, v. 66, 2017, p. 20-27.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.020>
- [30] MANES-LAZARO, R.; VAN DIEMEN, P.M.; PIN, C.; MAYER, M.J.; STEVENS, M.P. NARBAD, A. Administration of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 to chickens affects colonisation by *Campylobacter jejuni* and the intestinal microbiota. *British poultry science*, v. 58, n. 4, 2017, p. 373-381.
<https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1307322>
- [31] HOSSAIN, M.I.; SADEKUZZAMAN, MOHAMMAD; SAN-DO, HA. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: a review. *Food research international*, v. 100, 2017, p. 63-73.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.077>
- [32] MAJIDI-MOSLEH, A.; SADEGHI, A.A.; MOUSAVI, S.N.; CHAMANI, M.; ZAREI, A. Ileal MUC2 gene expression and microbial population, but not growth performance and immune response, are influenced by in ovo injection of probiotics in broiler chickens. *British poultry science*, v. 58, n. 1, 2017, p. 40-45.
<https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1237766>
- [33] INATOMI, TAKIO; AMATATSU, MAASAKI; ROMERO-PÉREZ, GUSTAVO-ADOLFO; INOUE, RYO; TSUKAHARA, TAKAMITSU. Dietary probiotic compound improves reproductive performance of porcine epidemic diarrhea virus-infected sows reared in a japanese commercial swine farm under vaccine control condition. *Frontiers in Immunology*, v. 8, 2017, p. 1877-1883.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01877>

Efecto del abono orgánico líquido mineralizado en la producción de biomasa de morera (*Morus alba*)*

Effect of organic fertilizer mineralized liquid in the biomass production of morera (*Morus alba*)

Efeito do adubo orgânico líquido mineralizado na produção de biomassa de morera (*Morus alba*)

CAMAYO-VARGAS, MARLON¹; MONTES-ROJAS, CONSUELO²; ANAYA-FLOREZ, MARÍA- DEL SOCORRO ³

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 7 de junio 2019

Aceptado para publicación: 3 de junio 2020

- * Proyecto de investigación de origen: "Evaluación de la eficacia del abono orgánico líquido mineralizado (A.L.O.F.A) en plantas de café (*Coffea arabica* L.)". Financiación: SENA – Universidad del Cauca. Finalización: diciembre 2018
- 1 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación para el Desarrollo Rural (Tull). Ingeniero Agropecuario. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-9714>
 - 2 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación para el Desarrollo Rural (Tull). MSc. Profesora de planta. Popayán, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8117-9465>
 - 3 Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. Licenciada en Biología. Popayán. Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9208-2845>

Correspondencia: cmontesr@unicauca.edu.co

Cómo citar este artículo : CAMAYO-VARGAS, MARLON; MONTES-ROJAS, CONSUELO; ANAYA-FLOREZ, MARÍA-DEL SOCORRO, Efecto del abono orgánico líquido mineralizado en la producción de biomasa de morera (*Morus alba*). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 230-243; Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)230-243](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)230-243)

RESUMEN

La investigación se realizó en las fincas La Sultana y El Madroño de los municipios de Timbio y El Tambo respectivamente, con el fin de evaluar el efecto del abono orgánico líquido mineralizado en el cultivo de morera con el propósito de analizar costos de producción, mejorar el rendimiento y hacer una agricultura amigable con el ambiente. En La Sultana la evaluación se realizó en el primer corte y en El Madroño en el tercer corte. En las dos fincas se usó un diseño en bloques completos al azar con siete tratamientos y tres repeticiones. La morera, en las dos fincas, se fertilizó cinco veces de acuerdo al tratamiento con aplicaciones alternas edáfica/foliar cada quince días; se evaluó altura de planta, biomasa, peso de hojas, peso de tallos, relación peso hojas/peso tallos, rendimiento de hojas y calidad nutricional de las hojas, se realizó análisis de varianza y prueba de comparación de promedios de Duncan ($P=0,005$): en La Sultana no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, el mejor tratamiento fue la aplicación de A.L.O.F.A. al 5%, mientras que en El Madroño los tratamientos sí presentaron diferencia estadísticamente significativa en las variables evaluadas y el mejor tratamiento fue la inoculación con IM y A.L.O.F.A. al 5%.

ABSTRACT

The research was carried out in La Sultana and El Madroño of the municipalities of Timbio and El Tambo respectively, in order to evaluate the effect of mineralized liquid organic fertilizer on mulberry cultivation in order to analyze production costs, improve yield and make an environment friendly agriculture. In La Sultana the evaluation was carried out in the first cut and in El Madroño in the third cut. A randomized complete block design with seven treatments and three repetitions was used on both farms. The mulberry, in the two farms, was fertilized five times according to the treatment with alternate edaphic / foliar applications every fifteen days; plant height, biomass, leaf weight, weight of stems, weight ratio of leaves / weight stems, leaf yield and nutritional quality of the leaves were evaluated, variance analysis and Duncan averages comparison test ($P=0,005$): in La Sultana there was no statistically significant difference between treatments, the best treatment was the application of ALOFA 5%, while in El Madroño the treatments did show statistically significant difference in the evaluated variables and the best treatment was inoculation with MI and A.L.O.F.A. at 5%.

RESUMO

A pesquisa foi realizada em La Sultana e El Madroño, dos municípios de Timbio e El Tambo, respectivamente, a fim de avaliar o efeito do fertilizante orgânico líquido mineralizado no cultivo de amoreira, a fim de analisar os custos de produção, melhorar o rendimento e fazer uma agricultura ecológica. Em La Sultana, a avaliação foi realizada no primeiro corte e em El Madroño no terceiro corte. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com sete tratamentos e três repetições em ambas as propriedades. A amoreira, nas duas fazendas, foi adubada cinco vezes, de acordo com o tratamento, com aplicações edáficas / foliares alternadas a cada quinze dias; avaliaram-se altura da planta, biomassa, peso foliar, peso das hastes, relação peso / caule, rendimento foliar

PALABRAS CLAVE:

Biofertilizante; Sostenibilidad; Evaluación; Investigación; Medioambiente; Fertilización; *Morus alba*.

KEYWORDS:

Biofertilizer; Sustainability; Evaluation; Research; Environment; Fertilization; *Morus alba*.

PALAVRAS-CHAVE:

Biofertilizante; Sustentabilidade; Avaliação; Pesquisa; Meio Ambiente; Fertilização, *Morus alba*.

e qualidade nutricional das folhas, análise de variância e teste de comparação das médias de Duncan ($P=0,005$): em La Sultana não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, o melhor tratamento foi a aplicação de ALOFA 5%, enquanto em El Madroño os tratamentos mostraram diferença estatisticamente significativa nas variáveis avaliadas e o melhor tratamento foi a inoculação com MI e A.L.O.F.A. a 5%.

INTRODUCCIÓN

La sericultura es el conjunto de actividades culturales y económicas que se desarrollan en torno a la seda [1] que integra tres componentes, el agrícola con el cultivo de morera *Morus sp*, el pecuario con la cría del gusano de seda *Bombyx mori* y el agroindustrial con la transformación del hilo en la industria textil, cosmética y la medicinal [2].

La morera es un árbol forrajero de origen asiático, adaptado a las condiciones del trópico que pertenece a la familia Moráceae. Existen 24 especies agrupadas en el género *Morus*, de las cuales la especie *Morus alba* es la más extendida [3]. Es un arbusto cuyo follaje es usado principalmente para la alimentación del gusano de seda (*Bombyx mori*) con el fin de obtener una fibra muy demandada por la industria textil, la seda. [4], mencionan que a pesar de que hace bastante tiempo existen las fibras sintéticas, la seda natural sigue siendo una de las más apreciadas por su suavidad y textura, lo que hace que sea una fibra con demanda en el mercado. Además, la morera es usada en la alimentación de otras especies, pues según [5], la morera es una especie forrajera que presenta características de calidad nutritiva, producción de biomasa y versatilidad agronómica importantes, representando así un potencial para mejorar la calidad alimenticia de las dietas e incrementar la producción de los animales como bovinos, ovinos, caprinos, aves, etc.

La seda se obtiene de los capullos del gusano de seda, los cuales se alimentan únicamente de la hoja de morera (*Morus alba*), por ello, para tener producción de seda con suavidad y textura, la morera con que se alimente al gusano de seda debe ser de la mejor calidad tanto sanitaria como en su estado nutricional, porque la calidad nutricional de la morera tiene gran influencia en el desempeño del gusano de seda, en todas las etapas de su desarrollo y la producción de capullo, que es de donde finalmente se produce la fibra [5].

Para lograr que la morera sea de calidad se debe tener en cuenta principalmente la nutrición de la planta, porque de esta depende un buen rebrote, cantidad y calidad de biomasa producida y el estado sanitario.

El manejo nutricional de la planta es un problema para los productores [4], porque los mayores rendimientos de materia verde, materia seca y proteína cruda en kg/ha/año se obtienen con fertilización química, adicionalmente, se ha demostrado que la morera responde de forma eficiente cuando se aplican dosis de 300 kg de N/ha/año [5], por ello se realizan aplicaciones de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados, de síntesis química, para tener un buen rendimiento, pero esta actividad la realizan sin tener en cuenta el análisis de suelo, y en la mayoría de los casos no se obtienen los resultados esperados, pero si se aumentan los costos. Ya se conocen los efectos negativos que han causado los químicos en el deterioro del medio ambiente, un ejemplo de ello es notorio en los cambios de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos cultivados [6].

Por lo anterior, se están buscando otras alternativas para la fertilización de la morera, en esta investigación se evaluó el efecto del abono orgánico líquido mineralizado A.L.O.F.A. en la producción de biomasa en un cultivo de morera (*Morus alba*), lo cual permitió disminuir costos de producción, mejorar el rendimiento y hacer una agricultura amigable con el ambiente.

MÉTODO

La investigación se realizó en la finca "El madroño", vereda Santa Bárbara, corregimiento de Piagua, municipio de El Tambo, ubicada a 2°26'45''N y 76°46'24''W; altura promedio de 1.745 m.s.n.m., con temperatura promedio

de 18°C; temperatura máxima promedia de 32°C y mínima promedia de 5°C; humedad relativa del 80%, y en la finca La Sultana, vereda Urubamba II, municipio de Timbío, departamento del Cauca ubicada a 00°58'54" y 03°19'04" de latitud norte y los 75°47'36" y 77°57'55" de longitud oeste; altitud promedio de 1.790 m.s.n.m. con precipitación promedio anual de 2000 mm, temperatura promedio de 18°C y humedad relativa de 73% . La metodología utilizada para la evaluación fue desarrollada en el proceso de investigación.

Abono líquido orgánico fermentado aeróbicamente y mineralizado

El A.L.O.F.A., aporta los elementos esenciales para la nutrición de las plantas, siendo un suplemento eficiente, económico y amigable con el medio ambiente. A continuación de relacionan las materias primas para preparar 20 L del biofertilizante: 18 L de agua lluvia, 5 kg de hojas de plantas sanas, 100 g de compost, 100 g de sulfato de cobre, 100 g de sulfato de zinc, 100 g de sulfato de magnesio, 100 g de sulfato de manganeso, 100 g de sulfato de calcio, 100 g de sulfato de hierro, 100 g de sulfato de potasio, 100 g de ácido bórico, 1 kg de miel de purga, 2 L de lixiviados de lombriz ó 100 mL de ácidos húmicos y fúlvicos, 500 g de fosforita huila, 50 g de levadura seca; 30 g de vitaminas y 100 mL de ácido cítrico (jugo de limón).

Para la preparación, se picaron las plantas y se colocaron en un recipiente plástico de 50 L, se agregaron 10 L de agua. Aparte, se realizó la dilución de los minerales cada uno en forma independiente. El sulfato de cobre se diluyó en 1 L de agua y 5 mL de jugo de limón y se homogenizó la mezcla, para los demás sulfatos se siguió el mismo procedimiento. Una vez realizadas todas las diluciones, se fueron agregando a la mezcla inicial de plantas y agua, el sulfato de hierro se añadió al final. Posteriormente, se agregó el bórax ó ácido bórico el cual se diluyó en agua caliente, luego la miel de purga disuelta en 2 L de agua, las vitaminas diluidas en un litro de agua, los ácidos húmicos y fúlvicos o el lixiviado de lombriz, la cal fosforita y el lompricompuesto, finalmente se añadió la levadura diluida en un litro de agua caliente (40°C). Una vez añadidas todas las materias primas, se homogenizó la mezcla y se cubrió el recipiente con yute, dejando en fermentación aeróbica por 15 días, pasado este tiempo, se separó el material sólido del líquido, donde el material líquido corresponde al A.L.O.F.A.

Una vez el abono estuvo estable o maduro listo, se tomó una muestra de un litro, para enviar al laboratorio, con el fin de realizar el análisis de caracterización y composición del A.L.O.F.A.

Toma de muestra para análisis de suelo

Antes de establecer la morera en el sitio definitivo, se realizó análisis de suelo y con esos resultados se determinó el plan de manejo nutricional. En la finca El Madroño y en La Sultana, se tomó una muestra del suelo de la rizósfera de 1 kg, para ello se tomaron 20 submuestras/ha en zigzag, en cada sitio se retiró la capa vegetal y luego se realizó un hueco en forma de "V" hasta 20 cm de profundidad, posteriormente se cortó una tajada de 3 cm de espesor en una de las paredes y de ésta se tomó la parte central, una vez se obtuvieron la totalidad de submuestras, estas se homogenizaron en un balde y de allí se obtuvo la muestra final la cual se envió al laboratorio debidamente rotulada.

Siembra de la morera

El material de siembra fue distinto en cada finca: en La Sultana se usaron esquejes previamente enraizadas de 40 cm de longitud, la siembra se realizó en huecos de 20 cm de lado y 30 cm de profundidad donde se depositaron y mezclaron 500 g de materia orgánica, en este hueco se colocó el esqueje enraizado a una profundidad de 20 cm y se presionó para evitar cámaras de aire, quedando visible únicamente de 15 a 20 cm del esqueje y de 5 a 8 yemas.

En El Madroño, la morera ya estaba establecida, la siembra se había realizado directamente en el lote, después de arado y rastrillado, se aplicaron 500 g de materia orgánica por sitio de siembra, mezclando con el suelo, se colocó el esqueje a una profundidad de 15 cm y luego se presionó alrededor del esqueje para que no quedaran cámaras de aire, quedando visible únicamente de 3 a 5 cm del esqueje y solo una yema.

Diseño Experimental

En las dos fincas se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 7 tratamientos y 3 repeticiones, La parcela útil estuvo constituida por 15 plantas, cada parcela tuvo 6 m de largo por 4,5 m de ancho.

En La Sultana, con el fin de homogenizar y fortalecer todas las plantas se realizó una fertilización foliar con la mezcla 550 ml de ALOFA + 55 ml de BP-150 llevando a un volumen final de 15 L, porque el lote venía de rastrojo. Los tratamientos se describen a continuación:

Tratamiento 0. Testigo, manejo convencional. Aplicación foliar del fertilizante CRECER 500 al 1% cada 15 días. Cre- cer 500 contiene 42% de N total, 0,4% de N amoniacal, 41,6% de N ureico, 3% de P_2O_5 , 3% de K_2O , 0,1% de CaO , 0,1% de MgO , 0,02% de S total, 0,02% de B, 0,002% de Co, 0,02% de Cu, 0,02 de Fe, 0,01% de Mn, y 0,005 % de Zn.

Tratamiento 1. Aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de A.L.O.F.A. en una concentración de 2,5%.

Tratamiento 2. Inoculación con la mezcla de 4 kg de inoculante micorrizico (IM) más 1,5L de coadyuvante, dilui- dos en 1.000 L de agua al suelo y aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de A.L.O.F.A. en una concentra- ción de 2,5%. El IM contiene 252000 esporas/lb de la mezcla de *Entrophospora colombiana*, *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum* y *Glomus clarum* todas en igual proporción.

Tratamiento 3. Aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de A.L.O.F.A. en una concentración de 5%.

Tratamiento 4. Inoculación con la mezcla de 4 kg de IM, más 1,5 L de coadyuvante diluidos en 1.000 L de agua al suelo y aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de ALOFA en una concentración de 5%.

Tratamiento 5. Aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de BP-150 en una concentración de 1,5%. El BP 150 contiene 45,05 g/L de Nitrógeno total (N), 34,00 g/L de P_2O_5 y 3,7 g/L de carbono orgánico oxidable.

Tratamiento 6. Inoculación con la mezcla de 4 kg de IM más 1,5 L de coadyuvante diluidos en 1.000 L de agua al suelo y aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de BP - 150 en una concentración de 1,5%.

La aplicación de los tratamientos realizados en se describen en el cuadro 1.

Para las aplicaciones edáficas de ALOFA se utilizaron 50 mL/planta; las aplicaciones foliares se realizaron con una aspersora hidráulica utilizando la boquilla TXVK 3 con una descarga de 190 mL/min, de baja descarga.

El corte y evaluación en La Sultana, se realizó a los 150 DDS y en el Madroño a los 90 días DDC, suspendiendo las aplicaciones 15 días antes para evitar que el follaje de la morera tuviera residuos de los fertilizantes que pudiera afectar el consumo y desarrollo del gusano de seda.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos

(DDC)*	Actividad realizada	Tipo de aplicación
7	Inoculación con HFM- ERGYFIT a T2,T4 yT6	Edáfica
15	Primera aplicación de los tratamientos	Edáfica
30	Segunda aplicación de los tratamientos	Foliar
45	Tercera aplicación de los tratamientos	Edáfica
60	Cuarta aplicación de los tratamientos	Foliar
75	Quinta aplicación de los tratamientos	Edáfica
90	Corte y evaluación de variables	NA**
*Días después del corte ** No aplica		

Prácticas culturales. Además de la fertilización, se realizó control de arvenses y control de plagas como labores culturales en todas las parcelas en las dos fincas.

En La sultana se realizó control de arvenses a los 15, 30, 60 y 120 DDS, se limpió completamente el plato de cada planta y se cortaron los arvenses de las calles para que quedaran con 5 a 10 cm de altura para tener cobertura vegetal y reducir al máximo la erosión. Se realizó control de chiza (*Phyllophaga spp.*) mediante aplicación edáfica de caldo de helecho (*Pteridium aquilinum*) mezclado con caldo de ceniza, y ocho días después se aplicaron edáficamente los siguientes microorganismos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Trichoderma atroviride* y la bacteria *Bacillus thuringiensis*. La presencia de la plaga se atribuye al alto contenido de material orgánico en descomposición presente en el suelo.

En el Madroño, se realizó únicamente un control de arvenses a los 8 DDC, se limpió completamente el plato de cada planta.

Determinación de costos. Los costos de la fertilización se determinaron para cada tratamiento realizado en cada finca.

Variables evaluadas

En las dos fincas se evaluaron:

Altura de la planta. Se midió la altura de 10 plantas por parcela, se tomó la altura desde el nivel del suelo hasta el ápice de la última hoja del rebrote más alto.

Peso de biomasa (hojas más tallo). Se cortaron 15 plantas de cada parcela y se pesaron para obtener biomasa total/parcela, se calculó el promedio de biomasa por planta/parcela.

Peso de las hojas. Se separaron las hojas de los tallos de las 15 plantas y se pesaron, se calculó el peso promedio de las hojas por planta/parcela. Al separar las hojas de los tallos se les quitó el peciolo porque el gusano de seda no lo consume.

Peso de tallos. Se pesaron los tallos y se calculó el peso promedio de los tallos por planta para cada parcela.

Relación peso de hojas/peso de tallos. Se dividió el peso de las hojas entre el peso de los tallos, para calcular la cantidad de unidades de peso de hojas producidas por cada unidad de peso de tallo producido por una planta.

Rendimiento de hojas sin peciolo (ton/ha). Se calculó extrapolando la producción de hoja de una planta a la producción de hoja del total de plantas en una hectárea (20.000 plantas).

Composición nutricional. Para evaluar la composición nutricional de la morera, se mezclaron las hojas de las plantas de cada tratamiento, se tomó una muestra de 300 g, se empacaron en sobres de manila, se rotularon y se enviaron al laboratorio para análisis bromatológicos.

RESULTADOS

Análisis de Suelo

Los resultados de La sultana y de El madroño permitieron cuadro 2 determinar que los suelos no cubren los requerimientos nutricionales de la Morera. Con base en estos resultados se determinaron los tratamientos, teniendo en cuenta que se aplicaría fertilización foliar y edáfica, se trabajó con las dosis mínimas.

Cuadro 2. Resultado análisis de suelo y requerimiento del cultivo.

Nutriente	Requerimiento	Aporte del suelo kg	
	(kg/ha/año)	La sultana	El madroño
Cal	1.000- 1.500		
N	350	179,2	150,08
P ₂ O ₅	100 a 150	6,37	8,06
K ₂ O	250	269,57	531,65

Comportamiento Agronómico

Las condiciones climáticas durante la fase de campo permitieron un buen prendimiento de los esquejes sembrados, durante el mes de siembra (abril) se presentaron lluvias abundantes y frecuentes que permiten la brotación adecuada de las yemas [7].

Durante el ciclo del cultivo no se presentaron enfermedades, por lo que no fue necesario establecer medidas de control, lo anterior, se atribuye a que las precipitaciones fueron escasas; días previos al corte y evaluación, se presentaron lluvias intensas que dieron origen a focos de mancha foliar causada por *Cercospora moricola*, la cual se presenta en condiciones de alta humedad y mala ventilación [7], en este caso se atribuye al cierre de las calles por el buen desarrollo de los rebrotes.

Caracterización y composición del A.L.O.F.A

Los resultados del análisis del A.L.O.F.A. (Cuadro 3) muestran que posee la mayoría de los nutrientes esenciales requeridos por las plantas, superando al abono orgánico comercial que solo contiene N, P y carbono orgánico.

Durante la fase de crecimiento, la morera toma muchos elementos del suelo tales como nitrógeno, fosforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, boro, manganeso, zinc, cobre y molibdeno [8]. Cada uno de estos elementos tiene una función específica en el crecimiento y metabolismo, la falta de alguno de ellos, afecta de alguna forma el normal desarrollo de la planta.

Cuadro 3. Resultado de análisis de caracterización y composición del A.L.O.F.A.

Parámetro	Resultado	Unid
Carbono orgánico	25,80	g/L
pH	4,86	
Densidad (20°C)	1,06	g/cm ³
Conductividad eléctrica	0,33	dS/m
Solidos insolubles	4,29	g/L
Nitrógeno orgánico	3,21	g/L
Fosforo soluble (P ₂ O ₅)	0,45	g/L
Potasio soluble en agua	11,40	g/L
Calcio Soluble (CaO)	1,91	g/L
Magnesio soluble (MgO)	2,33	g/L
Azufre soluble (S-SO ₄)	4,32	g/L
Hierro soluble	1,30	g/L
Manganeso soluble	2793,00	ppm
Cobre soluble	527,00	ppm
Zinc soluble	2018,00	ppm
Boro soluble	6,90	ppm
Sodio soluble	0,24	g/L

Cuadro 4. Promedios para las variables evaluadas en Morera en la sultana y el Madroño.

Tratamiento	Altura planta (cms)	Biomasa (g)	Peso tallo (g)	Peso hoja(g)	Relación hoja/ tallos	Rendimiento ton/ ha/corte
La sultana						
0	141,1	219,0	115,4	103,6	0,9	2,1
1	134,3	205,3	111,1	94,2	0,9	1,9
2	134,6	203,3	113,2	90,1	0,9	1,8
3	161,7	376,3	211,6	164,7	0,8	3,3
4	150,5	270,8	147,2	123,7	0,9	2,5
5	159,2	326,5	186,5	150,0	0,8	3,0
6	133,8	167,4	83,2	84,2	1,0	1,7
El madroño						
0	140,8	586,7	276,6	310,0	1,1	6,2
1	161,0	942,0	529,6	412,4	0,8	8,3
2	159,5	875,3	491,2	384,1	0,8	7,7
3	159,8	919,8	516,8	403,0	0,8	8,1
4	161,2	942,0	512,8	429,2	0,9	8,6
5	157,7	780,0	427,8	352,2	0,8	7,0
6	150,3	630,7	350,9	279,8	0,8	5,6

Terminada la fase en campo se obtuvieron los siguientes resultados:

En el cuadro 4 se relacionan los promedios obtenidos, en La sultana los tratamientos se evaluaron desde el momento de la siembra hasta el primer corte de morera. Se observa que los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento 3 que corresponde a aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días de A.L.O.F.A. en una concentración de 5%. En El Madroño, el cultivo estaba en segundo año de producción y la evaluación se hizo en el tercer corte. Los mejores resultados se obtuvieron con T4 que supera en rendimiento en 38,4% al testigo, el T4 corresponde a A.L.O.F.A. al 5% más IM, con aplicación alterna edáfica/foliar cada 15 días del A.L.O.F.A.

El análisis de varianza ($P=0,05$) no detectó diferencias entre repeticiones; entre los tratamientos en La sultana, solo hubo diferencias estadísticamente significativas en la relación peso hojas/peso tallos. En El Madroño en biomasa, peso de tallos, peso de hojas, relación peso hojas/peso tallos y rendimiento (cuadro 5).

La prueba de promedios de Duncan ($P=0,05$), para La sultana formó dos grupos en la relación peso hoja/peso tallos, uno conformado por T0 y T6 que presentaron las mejores relaciones, lo cual significa que en estos tratamientos se forma la mayor cantidad de unidades de peso de hojas por cada unidad de peso de tallo que la planta produce, lo cual es importante teniendo en cuenta que la parte aprovechable son las hojas. En el Madroño, formó 3 grupos en biomasa, peso de hojas y rendimiento y dos grupos para peso tallo y relación peso hoja/peso tallos (Cuadro 6).

Estos resultados coinciden con los reportados por [9] quienes obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la relación peso de hojas/peso de tallos, al comparar morera bajo diferentes planes de fertilización. Los resultados obtenidos en este estudio superan los reportados con una relación de 0,77 [9] y coinciden con otro en donde se encontraron diferencia estadísticamente significativa para componentes de rendimiento de morera con la aplicación de compostaje, lombricompost y fertilizante químico [10]. Además, es evidente que los tratamientos que incluyen el A.L.O.F.A. (T4, T3 y T1) comparados con el BP-150 (T5 y T6), presentan mejores resultados, corroborando lo enunciado por Chandanga *et al.* que mencionan que al faltar un nutriente se afecta de alguna forma el normal desarrollo de la planta; A.L.O.F.A. posee N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn y B y BP-150

Cuadro 5. Análisis de varianza para La sultana y El madroño.

Fuentes de variación		Suma de cuadrados	Gli	Cuadrados medios	F	Sig.
La Sultana						
Altura (cm)	Bloques	2,624.60	6	437.4	0.4	0.7
	Tratamientos	7,380.80	14	527.2	0.8	0.6
	Total	10,005.40	20			
Biomasa/ planta (g)	Bloques	102,432.90	6	17072.2	0.4	0.7
	Tratamientos	227859.4	14	16275.7	1.1	0.4
	Total	330292.3	20			
Peso tallos (g)	Entre bloques	38088	6	6348	0.3	0.7
	Entre trata- mientos	71133.5	14	5081	1.3	0.3
	Total	109221.5	20			
Peso hojas (g)	Bloques	17698.4	6	2949.7	0.5	0.6
	Tratamientos	42998	14	3071.3	1	0.5
	Total	60696.4	20			
Peso hojas/ Peso tallos	Bloques	0.1	6	0	0.4	0.7
	Tratamientos	0.1	14	0	1.5	*
	Total	0.2	20			
Rend. (ton/ha)	Bloques	7.1	6	1.2	0.5	0.6
	Tratamientos	17.2	14	1.2	1	0.5
	Total	24.3	20			
El Madroño						
Altura (cm)	Bloques	1033.3	6	172.2	1.10	0.16
	Tratamientos	1505	14	107.5	1.6	0.22
	Total	2538.3	20			
Biomasa/ planta (g)	Bloques	402300	6	67050	0.58	0.57
	Tratamientos	320861	14	22919	2.9	*
	Total	723160	20			
Peso tallos (g)	Bloques	169594	6	28266	0.45	0.64
	Tratamientos	137783	14	9842	2.9	*
	Total	307377	20			
Peso hojas (g)	Bloques	55762	6	9294	0.8	0.47
	Tratamientos	45831	14	3274	2.8	*
	Total	101594	20			
Peso hojas/ Peso tallos	Bloques	0.25	6	0.04	0.09	0.92
	Tratamientos	0.12	14	0.01	4.9	*
	Total	0.38	20			
Rend. (ton/ha)	Bloques	22.3	6	3.72	0.8	0.47
	Tratamientos	18.33	14	1.31	2.8	*
	Total	40.64	20			

solo posee N y P. Por lo anterior, la fertilización de morera con el A.L.O.F.A. arroja mejores resultados que al fertilizarla con BP- 150 porque este último contiene solo dos nutrientes [11].

La mayor relación peso de hojas/peso de tallos se obtuvo con los T0 y T6 (cuadro 5) donde por cada g de tallo la planta produce 0,97 y 1,12 g de hojas, donde el hecho de que en la biomasa de la morera las hojas tengan mayor proporción frente a los tallos, hace de esta planta un forraje de calidad superior a los forrajes convencionales, cuando este es utilizado para alimentación animal [11].

Por otra parte, los rendimientos obtenidos en la presente investigación están dentro del rango reportado por Reyes *et al.* [11] para morera de 2 años de establecida (donde el cultivo sedice alcanza el 65% de la producción y la plena producción se logra en el tercer año de establecida), con un plan de fertilización que incluye N, P, K y Ca provenientes de fertilizantes de síntesis química logrando rendimientos entre 6,82 y 7,8 ton/ha/corte. Lo anterior evidencia la importancia de fertilizar la morera, en este caso, la fertilización con A.L.O.F.A. permitió obtener rendimientos muy similares e incluso mayores a los obtenidos con la fertilización de síntesis química, con la ventaja de que hay un manejo ambientalmente responsable porque se evitan las alteraciones negativas en el suelo como la acidez residual que causan los fertilizantes de síntesis química [12].

Cuadro 6. Prueba de promedios de Duncan para la relación peso hojas/peso tallos en La Sultana.

Tratamiento	Subgrupo para alfa 0 =,05		
La sultana			
3	0,79		
5	0,81		
2	0,85		
1	0,87		
4	0,87		
0		0,92	
6		0,97	
El madroño			
Biomasa			
0	586,7		
6	630,7		
5	780		
2		875,3	
3			919,8
1			942
4			942
Peso tallo			
0	276,6		
6	350,9		
5	427,8		
2		491,2	
4		512,8	
3		516,8	
1		529,6	
Peso Hojas			
6	279,8		
0	310		

*Diferencia estadísticamente significativa al 5%

A pesar de que no hay diferencias estadísticamente significativas en rendimiento en La sultana, el T3 supera al testigo en 58,9%, con lo cual se podrán criar 2,71 cajas adicionales de gusano de seda en el primer corte, que significan 108,4 kg de capullo fresco y 10,84 kg de seda más con respecto al tratamiento testigo, esto, teniendo en cuenta que una caja de 20.000 gusanos de seda consumen aproximadamente 450 kg de hoja de morera desde el nacimiento hasta el encapullado y produce 40 kg de capullo fresco que finalmente serán 4 kg de seda.

La morera, en el primer año de establecida, solo produce el 30% de hoja con respecto a la plena producción, en el segundo año produce 65% y el 100% en el tercer año, es decir que a partir del segundo y tercer año en adelante el rendimiento aumentará porque la evaluación se realizó en el primer año de establecida la morera [12].

Composición nutricional

Los resultados del análisis bromatológico para cada tratamiento (**cuadro 7**), de muestras tomadas en el momento del corte (150 DDS) en La sultana y (90 DDC) en El Madroño, se observa que las diferencias en las variables bromatológicas son mínimas, lo cual indica que los tratamientos no incidieron en la calidad nutricional del forraje.

En cuanto a materia seca y proteína cruda, los resultados obtenidos en esta investigación superan a los reportados para morera de 31,5% y de 18,1% respectivamente [12], mientras que en el caso de fibra cruda los resultados de esta investigación son inferiores a los reportados (24,3%) [13] siendo esto muy importante, pues los altos contenidos de fibra influyen en la digestibilidad del alimento provocando un menor peso promedio de larvas y por consiguiente un menor desarrollo de las glándulas de seda [14].

Se reportan valores de proteína cruda para la morera con fertilización nitrogenada de síntesis química entre 18 y 24%, rango en el cual están ubicados todos los tratamientos realizados en el presente estudio [15].

Al evaluar la calidad de hojas de morera, representada por el tenor de proteína y su influencia en la cría del gusano de seda [16], determinaron que niveles de proteína alrededor de 21% presentan los mejores resultados en variables como peso de larvas, peso de capullos y tamaño de capullos en comparación con niveles de proteína

Cuadro 7. Relación de resultados del análisis bromatológico por tratamiento, en La Sultana.

Tratamiento	% MS	%EE	%FC	%PC	%ENN	%CENIZAS	%P	%Ca
La Sultana								
T0	38,1	2,28	14,9	19,9	51	11,9	0,33	2,08
T1	37,2	2,62	19,8	20,4	43,9	13,3	0,37	2,5
T2	38,3	1,85	20,5	18,7	45,3	13,6	0,42	2,74
T3	37	2,22	19,5	20,6	44,6	13,1	0,39	2,88
T4	38,6	2,18	18,7	18,7	45,6	14,8	0,36	2,97
T5	35,4	2,79	17,4	20,7	46,8	12,3	0,34	2,36
T6	37,4	2,3	18,4	20,6	45,2	13,5	0,34	2,41
El Madroño								
T0	40,8	1,75	11,00	18,3	60,1	9,06	0,31	1,83
T1	36,7	2	17,7	21,2	49,4	9,74	0,35	1,77
T2	45,3	1,98	12,9	19,4	55,8	9,91	0,25	2,14
T3	36,2	2,42	14,7	21,2	52,2	9,44	0,37	1,87
T4	41,10	2,15	15,9	18,9	53,6	9,5	0,24	2,09
T5	35,2	2,53	19,8	20,9	46,8	10,00	0,39	2,03
T6	34,2	1,92	15,3	22,6	50,3	9,85	0,33	1,63

MS: materia seca; EE: extracto etéreo (grasas), FC: fibra cruda; PC: proteína cruda; ENN: extracto no nitrogenado; P: fósforo y Ca: Calcio

cercanos al 11%. La mayoría de los tratamientos evaluados en esta investigación presentan niveles de proteína alrededor del 21%, por lo que se espera que los gusanos que se alimenten con esta morera, al final del ciclo presenten buen peso y su rendimiento en capullo fresco sea alto.

Costos de fertilización e inoculación por tratamiento

Se determinaron para cada tratamiento por corte. En La Sultana, la evaluación se hizo en el primer año de establecida; el T1 fue el que presentó menor costo (\$540.775) y el T6 presentó el mayor (\$4.338.880), El T3 fue el de mejor rendimiento y su costo fue de \$586.550 siendo 0,37% más económico que el T0.

La morera alcanza la máxima producción en el tercer año, de acuerdo con lo anterior y, teniendo en cuenta que la inoculación se hace una única vez en todo el ciclo de vida de la morera (15 años), al proyectar el rendimiento de hoja y costos de fertilización e inoculación desde el año uno hasta el tercer año, se obtiene que si el T3 continúa con 58,9% más de rendimiento respecto a T0, este permitirá criar hasta 36,1 cajas de gusano de seda al año, con 0,37% menos costos que el testigo para cuando el cultivo se encuentre en plena producción, es decir al tercer año de establecida [17].

Este decrecimiento en costos por fertilización al usar el T3 parece insignificante, pero además de la reducción en los costos de fertilización, en el año 3, se logra obtener 16,27 ton de hoja por año más que T0, lo cual permitirá criar 36,1 cajas más al año, aumentando los ingresos al vender 36,1 cajas más de las que inicialmente vendía. Cabe resaltar que esta disminución en los costos por fertilización y aumento de ingresos se lograra siempre y cuando el sericultor prepare en su finca el A.L.O.F.A.

En El Madroño, la evaluación se hizo en morera que iniciaba el segundo año de establecida, se evidenció que el T1 fue el que presentó menor costo (\$558.050) y el T6 el mayor (\$4.443.060), coincidiendo con los resultados obtenidos en la sultana. Los costos de fertilización e inoculación fueron más altos en El Madroño, lo cual se debe a la edad de la morera (inicia segundo año).

Al proyectar el rendimiento de hojas y costos de fertilización e inoculación por año, desde el año dos hasta el tercer año, los mejores resultados se obtienen cuando el cultivo llegue a plena producción con el T4. Al comparar el T4 refleja en el año 3 una reducción de 10,05% en costos de fertilización e inoculación, con un aumento en la producción de 38,95% (14,80 ton) más de hoja de morera que el testigo (T0), lo cual permite criar 32,8 cajas más de gusano de seda al año.

Teniendo en cuenta que a partir del tercer año no hay inoculación con IM que es la que aumenta costos de fertilización e inoculación en el segundo año, se resalta que esta inversión se recupera con el aumento en la producción del segundo año, de acuerdo con las evidencias reflejadas en el aumento de la producción desde el primer corte y la ganancia se observa en la producción proyectada de los ingresos durante todo el ciclo productivo de la morera.

El T4 y el T3 muestran diferencia significativa en el rendimiento, el T4 supera en producción en 6,45% al T3, la diferencia se explica porque la inoculación aumenta el rendimiento de hoja de morera al mejorar la disponibilidad de nutrientes. El 90% de los mayores costos de fertilización/inoculación del segundo año del T4, se recuperan en el mismo año con el rendimiento, a partir del tercer año la ganancia supera al T3 y se mantiene a lo largo del ciclo productivo.

Al comparar T3 con T0, se observa que el T3 aumenta en 30,53% (11,6 ton/ha/año) el rendimiento de hoja de morera y reduce en un 10,05% los costos de fertilización en el año tres frente al T0.

La morera tiene un ciclo productivo económicamente rentable hasta los 15 años de producción después de su establecimiento, logrando y estandarizando su mayor producción a partir del tercer año y sosteniéndose hasta el año 15 [18]. Teniendo en cuenta que el T4 y el T3 producen 14,8 y 11,6 ton/ha/año respectivamente, más que el T0, se realizó la proyección de los ingresos adicionales que tendrá el productor. Se obtuvo que, en los 15 años

de duración del cultivo de morera, si el sericultor lo fertiliza con A.L.O.F.A. en concentración de 5% e inocula con IM (T4vsT0) obtendrá \$269.696.000 pesos más que con el manejo tradicional y si solo fertiliza con el A.L.O.F.A. en concentración de 5% obtendrá \$203.889.777,78 pesos más que con manejo tradicional.

CONCLUSIONES

Existe efecto de la fertilización con A.L.O.F.A. en producción de biomasa y costos de fertilización e inoculación de morera. En La Sultana se obtuvo un 58,9% más de rendimiento y una disminución del 0,37% en los costos de fertilización e inoculación con respecto al manejo tradicional; en el Madroño se obtuvo un 38,95% más de rendimiento y una disminución del 10,05% en costos de fertilización e inoculación, en el año tres, comparado con el manejo tradicional.

La fertilización edáfica/foliar con A.L.O.F.A. al 5% supero a la fertilización con abono orgánico comercial. Se obtuvo un 9,67% y 17,19% más de rendimiento en La Sultana y El Madroño respectivamente, en comparación con el abono orgánico líquido comercial.

La inoculación con IM aumenta la eficiencia de la fertilización debida principalmente al mejoramiento de la nutrición fosfórica, por esta razón debe considerarse como una inversión y no como un costo adicional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Cauca, al SENA y al ingeniero Antonio Marín por el apoyo en la realización de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] FARAHANIAN, MARYAN; SALEHI-ARJMANDA, HOSSEIN; KHADIVIB, ALI; AKRAMIANA, MORTEZA. Phenotypic diversity among *Morus alba* var. nigra genotypes as revealed by multivariate analysis. *Scientia Horticulturae*, v.248, 2019, p. 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.055>
- [2] BASSO, C.P.; DE BARGAS, S.A.; DOBLER, S. Evaluación económica de la producción de seda en la zona de Realicó (La Pampa, Argentina). *Archivos de Zootecnia* v. 66, n. 254, 2017, p. 189-193. <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2321>
- [3] PENTÓN-FERNÁNDEZ, G.; MARTÍN-MARTÍN, GIRALDO-JESÚS; RIVERA-ESPINOSA, RÁMON-ANTONIO; MARTÍN-ALONSO, GLORIA-MARTA; GONZÁLES-CAÑIZARES, PEDRÓ-JOSÉ; OROPEZA-CASANOVA, KATERINE. Manejo de la nutrición y la defoliación de *Morus alba* (L.) var. tigreada para la producción de hojas. *Pastos y Forrajes*, v. 39, n. 4, 2016, p. 252-258.
- [4] REINO-MOLINA, JORGE-JESÚS; MONTEJO-VALDÉS, LAURA A.; SÁNCHEZ-RENDÓN, JORGE-ALBERTO; MARTÍN-MARTÍN, GIRALDO-JESÚS. Seed characteristics of five mulberry (*Morus alba* L.) varieties harvested in Matanzas, Cuba. *Pastos y Forrajes*, v. 40, n. 4, 2017, p. 259-263.
- [5] THONGPRAJUKAEW, KARUN; CHOTIMANOTHU, BANTHARI; KOVITVADHI, ATTAWIT; KOVITVADHI, UTHAIWAN; PAKKONG, PANNEE. The effects on in vitro digestibility from different developmental stages of silkworm larvae, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) and position of mulberry leaves, *Morus alba* (Rosales: Moraceae). *Journal of Asia - pacific entomology* v. 20, n. 4, 2017, p. 1134-1139. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.005>
- [6] FRANCH, RICARDO; NAVARRO, GERMAN. Las rutas de la seda en la historia de España y Portugal. 1 ed. Valencia (España): Universitat de València, 2018, 454 p.

- [7] CHAKRABORTYA, BARNA; KUNDUB, MANAB; CHATTOPADHYAY, R.N. Organic Farming with Bio-mulching—A New Paradigm for Sustainable Leaf Yield & Quality of Mulberry (*Morus alba* L.) under Rainfed Lateritic Soil Condition. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 11, 2016, p. 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.006>
- [8] ROHELAA, G.K. *et al.* In vitro regeneration and assessment of genetic fidelity of acclimated plantlets by using ISSR markers in PPR-1 (*Morus* sp.): An economically important plant. *Scientiae Horticulturae*, v. 241, 2018, p. 313-321. <https://doi.org/acceso.unicauca.edu.co/10.1016/j.scienta.2018.07.012>
- [9] MARTÍN-MARTÍN, GIRALDO; RIVERA-ESPINOSA, RAMÓN; MARTÍN-ALONSO, GLORIA M.; MACHADO-CASTRO, REY; HERRERA-ALTUVE, JOSÉ A. Efecto del intervalo de corte y el manejo de la nutrición en plantaciones de morera (*Morus alba* L.). *Producción de forraje. Pastos y Forrajes* v. 39, n. 2, 2016, p. 111-118.
- [10] VÁSQUEZ, H.B.; MARAVÍ, C. Efecto de fertilización orgánica (biol y compost) en el establecimiento de morera (*Morus alba* L.). *Revista RICBA* v. 1, n. 1, 2017, p. 33-39. <https://10.25127/ricba.201701.004>
- [11] REYES, S.N.; VIVAS, J.; AGUILAR, P.; HERNÁNDEZ, J.; CALDERA, N., Suplementación de cobayos (*Cavia porcellus*) con follaje fresco de morera (*Morus alba*) y moringa (*Moringa oleifera*). *Revista científica la calera* v. 18, n. 30, 2018, p. 7-13. <https://doi.org/10.5377/calera.v18i30.7733>
- [12] SÁNCHEZ-SALCEDO, EVA M.; SENDRA, STHIR; CARBONELL-BARRANCHINA, ÁNGEL; MARTÍNEZ, JUAN-JOSÉ; HERNÁNDEZ, FRANCISCA. Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries. *Food Chemistry*, v. 190, 2016, p. 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.008>
- [13] CARDONA-IGLESIAS, JUAN-LEONARDO; MAHECHA-LEDEZMA, LILIANA; ANGULO-ARIZALA, JOAQUIN. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*, v. 28, n. 1, 2017, p. 273-288. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43748637022>
- [14] HERNÁNDEZ-MORALES, JAHDAL; SÁNCHEZ-SANTILLÁN, PAULINO; TORRES-SALADO, NICOLÁS; HERRERA-PÉREZ, JERÓNIMO; ROJAS-GARCÍA, ADELAIDO R.; REYES-VÁSQUEZ, IVÁN; MENDOZA-NÚÑEZ, MARIO A. Composición química y degradaciones in vitro de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, v. 9, n. 1, 2018, 16 p. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4332>
- [15] WEI-CHIANG, ERIC; PHUI-YAN, LYE; SIU-KUIN, WONG. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chinese Journal Natural Medicines*, v. 14, n. 1, 2016, p. 17-30. <http://doi.10.3724/SP.J.1009.2016.00017>
- [16] WANG, DUJUN; JIANG, JIAYI; LIU, JIA; WANG, DAN; YU, XIAOFENG; WEI, YUAN; OUYANG, ZHEN. Cloning, expression, and functional analysis of lysine decarboxylase in mulberry (*Morus alba* L.). *Protein Expression and Purification* v. 151, 2018, p. 30-37. <https://doi.org/acceso.unicauca.edu.co/10.1016/j.pep.2018.06.004>
- [16] FONSECA-LOPEZ, DANIA; RODRÍGUEZ-MOLANO, CARLOS-EDUARDO. Efecto de un inoculante microbiano sobre la calidad microbiológica y nutricional de ensilaje de *Morus alba* L. y *Sambucus nigra* L. *Revista Logos, Ciencia & Tecnología*, v. 11, n. 2, 2019, p. 93-101. <http://dx.doi.org/10.22335/rict.v11i2.825>
- [17] KAUSHAL, R.; KUMAR, A.; ALAM, N.M.; MANDAL, D.; JAYAPARKASH, J.; TOMAR, J.M. S.; CHATURVEDI, O.P. Effect of different canopy management practices on rainfall partitioning in *Morus alba*. *Ecological Engineering*, v. 102, 2017, p. 374-380. <https://doi.org/acceso.unicauca.edu.co/10.1016/j.ecoleng.2017.02.029>
- [18] CHACÓN-HERNÁNDEZ, PABLO; BOSCHINI-FIGUEROA, CARLOS. Peso estimado en cabras con una cinta comercial de pesaje y perímetro torácico. *Agronomía Mesoamericana* v. 28, n. 1, 2017, p. 229-236. <http://doi:10.15517/am.v28i1.21611>

Evaluación agronómica de genotipos de *Theobroma cacao* L. en la Amazonia colombiana*

Agronomic evaluation of *Theobroma cacao* L. genotypes in the colombian Amazon

Avaliação agrônômica de genótipos de *Theobroma cacao* L. na Amazônia colômbiana

GAMBOA-TABARES, JEAN-ALEXÁNDER¹; RODRÍGUEZ-ORTIZ, JAIME-ANDRÉS²;
GAMBOA-TABARES, ARMANDO³; DURÁN-BAUTISTA, ERVIN-HUMPREY⁴;
ROJAS-VARGAS, SORAIDA⁵

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 13 de Febrero 2020.

Aprobado para publicación: 23 de Octubre 2020.

* Título del proyecto de origen: “Desempeño agronómico, evaluación fitosanitaria y caracterización molecular de clones promisorios de *Theobroma cacao* L. provenientes de materiales vegetales élite presentes en sistemas productivos del Bajo Caguán, municipio de Cartagena del Chairá”. Financiación: Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, Universidad de la Amazonia y Comité de Cacaoteros de Remolinos del Caguán y Suncillas CHOCAGUÁN. Culminación: 2020.

- 1 Universidad de la Amazonia, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroecológica, Grupo de Investigación en Entomología Universidad de la Amazonia (GIEUA). M.Sc. en Agricultura Ecológica. Florencia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8783-0175>
- 2 Universidad de la Amazonia, Facultad de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Biológicas, Grupo de Investigación en Agroecosistemas y Conservación en Bosques Amazónicos (GAIA). Mg. en Ciencias Biológicas. Florencia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0973-8549>
- 3 Universidad de la Amazonia, Facultad de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Biológicas. Mg. en Ciencias Biológicas. Florencia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-5777-8495>
- 4 Universidad de la Amazonia, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroecológica, Grupo de Investigación en Agroecosistemas y Conservación en Bosques Amazónicos (GAIA). Mg. en Agroforestería. Florencia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-4155-6350>
- 5 Universidad de la Amazonia, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroecológica, Grupo de Investigación en Agroecosistemas y Conservación en Bosques Amazónicos – GAIA. Ingeniero Agroecólogo. Florencia, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-4860-2954>

RESUMEN

Los clones universales de cacao (*Theobroma cacao* L.) introducidos en la región amazónica de Colombia, presentan bajos rendimientos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento agronómico de genotipos locales promisorios de *T. cacao* bajo las condiciones de la Amazonia Colombiana. El vivero y parcela experimental se establecieron en la vereda Cuba, municipio de Cartagena del Chairá. En la parcela experimental se implementó un diseño experimental Factorial 7 x 4, con Factor A (genotipos) y Factor B (distancias de siembra). En vivero se evaluó la altura y el diámetro del tallo del clon portainjerto IMC-67, y en la parcela experimental el prendimiento y desempeño agronómico de siete genotipos. El clon IMC-67 tuvo germinación del 95%, velocidad de crecimiento de 0,200 cm.día⁻¹, e incremento en diámetro del tallo de 0,003 cm.día⁻¹. Los siete genotipos presentaron prendimiento del injerto del 95,73%, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). La altura total (cm), longitud de injerto (cm), diámetro del portainjerto (cm), número de hojas y área de copa (m²), presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). El genotipo RMC-4, presentó mayores valores de biomasa seguido de los genotipos RMC-2 e ICS-1, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre los genotipos evaluados. Se concluye que los genotipos promisorios RMC-3, RMC-4 y RMC-5, presentan potencial para su consolidación como clones universales en el futuro.

ABSTRACT

The universal clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) introduced in the Colombian Amazon region, present low yields. The objective of this work was to evaluate the agronomic behavior of promissory local genotypes of *T. cacao* under the conditions of the Colombian Amazon. The nursery and experimental plot were established on the rural division of Cuba in Cartagena del Chairá town. A 7 x 4 Factorial Experiment was implemented, with Factor A (genotypes) and Factor B (planting distances). In the nursery, height and stem diameter of the IMC-67 rootstock clone were evaluated, and in the experimental plot the agronomic yield and performance of seven genotypes. IMC-67 clone had 95% of survival, a growth rate of 0,200 cm.day⁻¹, and an increase in stem diameter of 0,003 cm.day⁻¹. The seven genotypes showed 95,73% of survival, without statistically significant differences ($p < 0,05$). The total height (cm), graft length (cm), rootstock diameter (cm), number of leaves and treetop area (m²), showed statistically significant differences ($p < 0,0001$). RMC-4 genotype showed higher biomass values followed by the RMC-2 and ICS-1 genotypes, without sta-

PALABRAS CLAVE:

Cacao; Agroforestal; Desarrollo; Caracterización; *Theobroma cacao* L.

KEYWORDS:

Cocoa; Agroforestry; Development; Characterization; *Theobroma cacao* L.

PALAVRAS-CHAVE:

Cacau; Agroflorestas; Desenvolvimento; Caracterização; *Theobroma cacao* L.

Correspondencia: j.gamboa@udla.edu.co

Cómo citar este artículo: GAMBOA-TABARES, JEAN-ALEXÁNDER; RODRÍGUEZ-ORTIZ, JAIME-ANDRÉS; GAMBOA-TABARES, ARMANDO; DURÁN-BAUTISTA, ERVIN-HUMPREY; ROJAS-VARGAS, SORAIDA. Evaluación agronómica de genotipos de *Theobroma cacao* L. en la Amazonia colombiana. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 244-255. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)244-255](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)244-255)

tistically significant differences ($p < 0,05$), among the genotypes evaluated. We concluded that the RMC-3, RMC-4 and RMC-5, present potential for consolidation as universal clones in the future.

RESUMO

Os clones universais de *Theobroma cacao* L. introduzidos na região amazônica colômbiana apresentam baixos rendimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento agrônomo de genótipos locais promissores de *T. cacao* em condições da Amazônia colômbiana. O viveiro e a chácara experimental foram estabelecidos na Vereda Cuba, município de Cartagena del Chairá. Na chácara experimental foi implementado um experimento fatorial 7×4 , com o fator A (genótipos) e o fator B (distâncias de plantio). No viveiro foi avaliado a altura e diâmetro do caule do clone porta-enxerto IMC67, e na chácara experimental a germinação e desempenho agrônomo de sete genótipos. O clone padrão IMC67 teve 95% de germinação, taxa de crescimento de $0,200 \text{ cm.dia}^{-1}$ e aumento no diâmetro do caule de $0,003 \text{ cm.dia}^{-1}$ os sete genótipos apresentaram germinação do caule de 95,73%, sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A altura total (cm), comprimento do enxerto (cm), diâmetro do porta-enxerto (cm), número de folhas e área da copa (m^2), apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$). O genótipo RMC4, apresentou maiores valores de biomassa, seguido pelos genótipos RMC2 e ICS1, sem diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), entre os genótipos avaliados. Conclui-se que os promissores genótipos RMC3, RMC4 e RMC5 apresentam potencial para sua consolidação como clones universais no futuro.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.-Malvaceae) es un árbol frutal originario de la selva tropical húmeda en la cuenca del Amazonas [1]. La investigación genómica indica que la mayor diversidad de *T. cacao* se encuentra en el Noroeste de América del Sur, señalando esta región como su centro de origen [2]. El cacao fue llevado a Mesoamérica, donde el uso y domesticación pudo haber comenzado hace aproximadamente 3600 años [3]. El cultivo se expandió luego a otras regiones, notablemente en el siglo XIX, por lo que en la actualidad es producido en 40 países ubicados en la región tropical de África, Asia y América [4].

Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Brasil y Nigeria son los principales productores de cacao en el mundo [5]. Los granos de cacao se exportan principalmente a Europa y América del Norte para su procesamiento [6]. En el mercado internacional del cacao se comercializan el grano seco, residuos (cáscaras, cortezas, cascarillas y desechos de cacao), pasta, torta, manteca, polvo y chocolate [7]. Los mayores consumidores de productos de cacao son Estados Unidos (20%), Alemania (9%), Francia (6%), Reino Unido (6%), Brasil (5%), Rusia (5%) y Japón (4%) [8]. En los países en que se cultiva, es una fuente de ingresos para pequeños agricultores, que dependen principalmente del trabajo familiar [9]. En Colombia, la cadena productiva del cacao está conformada por aproximadamente 35.000 familias en diferentes regiones del país, que generan aproximadamente 100.000 empleos en actividades de productos intermedios y finales [10]. Durante el año 2018, Colombia tuvo un área cosechada de 190469 hectáreas (ha) y una producción de 101019 toneladas (t), lo que indica un rendimiento promedio nacional de $0,53 \text{ t.ha}^{-1}$; la participación del departamento del Caquetá en la producción nacional fue de 1,55%, [11]. Durante el año 2019, el país alcanzó una producción de 59665 t de grano seco [12].

La práctica cultural dominante del cultivo de cacao en la Amazonia, implica la tumba y quema de bosques o barbechos, para sembrar especies de sombrío temporal como son el plátano (*Musa x paradisiaca* L.-Musaceae) y banano (*Musa x sapientum* L.-Musaceae), y el establecimiento de maderables para sombrío definitivo. Con respecto a los materiales genéticos de cacao, las plantaciones de más de 30 años se establecieron con árboles de origen híbrido resultado de la polinización cruzada entre clones universales introducidos y árboles silvestres. Como innovación tecnológica en el sector, las nuevas plantaciones se han establecido principalmente con los clones TSH-565, ICS-1, ICS-39, ICS-60, ICS-95, EET-8 y CCN-51, injertados en portainjertos de origen híbrido del clon IMC-67.

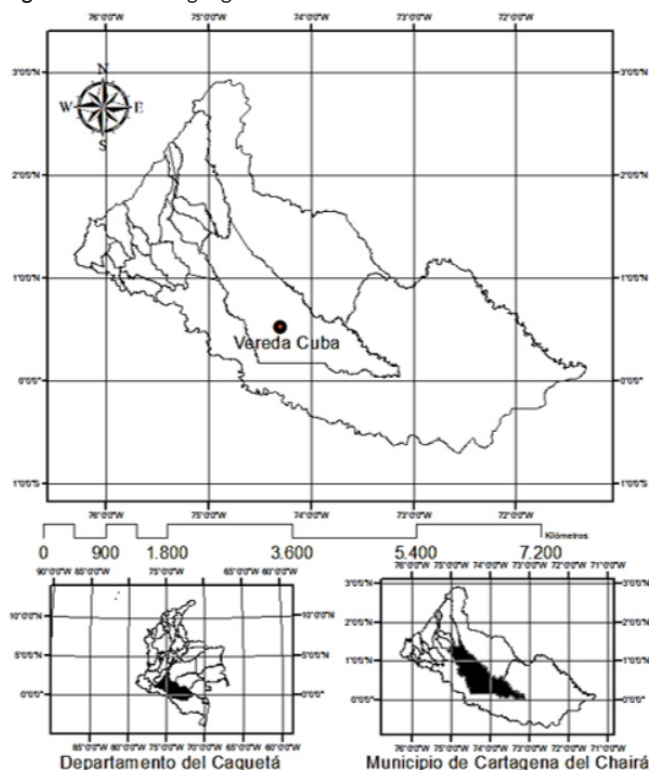
En la región Amazónica se desconoce el recurso genético de *T. cacao* correspondiente a materiales autóctonos, adaptados a las condiciones edáficas y climáticas de la región. Personal técnico y científico del Comité de Cacaoteros de Remolinos del Caguán y Suncillas CHOCAGUÁN, seleccionaron a través del modelo de mejoramiento genético participativo, materiales promisorios de cacao provenientes de árboles híbridos de polinización abierta con buena adaptabilidad a los suelos, tolerancia a plagas y enfermedades y altos rendimientos en producción de grano seco, a los cuales se les asignaron los códigos RMC-1, RMC-2, RMC-3, RMC-4 y RMC-5. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el comportamiento agronómico de cinco genotipos promisorios de *Theobroma cacao* L. establecidos en arreglo agroforestal, bajo las condiciones agroecológicas de la Amazonia colombiana.

MÉTODO

El vivero y la parcela experimental se establecieron en la vereda Cuba del corregimiento de Remolinos del Caguán, municipio de Cartagena del Chairá, departamento de Caquetá, ubicado a 00°31'53" de latitud norte y 74°17'48" de longitud oeste (Figura 1). El sitio presenta temperatura media de 29,5°C, precipitación anual de 3800 mm, humedad relativa del 84%, brillo solar de 1700 horas. año⁻¹, 183 m de altitud y corresponde a la zona de vida Bosque Húmedo Tropical [13].

El establecimiento del vivero se realizó en un terreno de 10 x 12 m (120 m²), en el que se construyó un umbráculo con polisombra al 75%. Se prepararon 10 t de sustrato para el llenado de las bolsas y posterior siembra de la semilla, cuyas proporciones fueron 94% de suelo (rico en materia orgánica obtenido en el predio), 3% de mantillo de bosque o capote (fuente de microorganismos benéficos y materia orgánica), 2% de roca fosfórica (Fosforita Huila P₂O₅ 28% y CaO 40%), y 1% de cascarilla de arroz. Se usaron bolsas con capacidad de 2 kg, con dimensiones de 0,15 mm de espesor, 10 cm de ancho y 30 cm de largo, con perforaciones y fuelle.

Figura 1. Ubicación geográfica del área de estudio.



El material vegetal usado como portainjerto se obtuvo de semillas certificadas del clon IMC-67 suministradas por la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), procedentes del Municipio de San Vicente de Chururí en el Departamento de Santander, las que estaban pregerminadas al momento de siembra. Se realizaron 6 muestreos de la altura (cm) y diámetro a 1 cm del suelo (cm) a cada planta, desde los 17 dds (días después de siembra) hasta los 123 dds, con intervalos de 20 días entre muestreos.

Finalizada la etapa de vivero, se seleccionaron las 2506 plantas que presentaron mayor altura y diámetro del tallo; éstas se llevaron a un campo experimental de 3 ha bajo condiciones de arreglo agroforestal, asociadas con plátano (*Musa x paradisiaca*) y abarco (*Cariniana pyriformis* Miers-Lecythidaceae). Se utilizó un Experimento Factorial 7 x 4, en Diseño Completamente al Azar, con Factor A correspondiente a siete clones (RMC-1, RMC-2, RMC-3, RMC-4, RMC-5, ICS-1 e ICS-60) y Factor B que corresponde a cuatro distancias de siembra (3,0 x 3,0 m, 3,5 x 3,5 m, 3,0 x 4,0 m y 4,0 x 4,0 m), para un total de 28 unidades experimentales. Cada unidad experimental correspondió a un área de 1056 m² (24 x 44 m). Diez meses posteriores al trasplante del patronaje de cacao a sitio definitivo, las plantas se injertaron con los genotipos promisorios (RMC-1, RMC-2, RMC-3, RMC-4, RMC-5) y clones universales (ICS-1 e ICS-60) mediante técnica de injerto lateral o aproximación. El material vegetal fue obtenido del jardín clonal a pequeña escala (JCPE) de propiedad del Comité de Cacaoteros de Remolinos del Caguán y Suncillas (CHOCA-GUÁN), ubicado en el corregimiento de Remolinos del Caguán, previa estimulación de los árboles mediante poda y fertilización. Transcurridos 30 días desde la injertación, se evaluó el resultado del prendimiento de los injertos para cada uno de los genotipos de cacao, el cual consistió en determinar el estado del material injertado de cada planta, clasificado en yemas latentes (tejido vivo sin desarrollo foliar), brote (inicio de desarrollo de la yema) o muerta (yemas muertas), y se determinó el porcentaje de prendimiento total para cada subparcela experimental.

Para la evaluación agronómica de los clones (promisorios y universales), se desarrollaron dos muestreos no destructivos mediante la selección aleatorizada de cinco plantas por unidad experimental. El primer muestreo se realizó 20 meses posteriores al trasplante en campo (13 meses después de la injertación) y el segundo muestreo 34 meses posteriores a trasplante (27 meses después de la injertación). También, se realizó muestreo destructivo a los 27 meses posteriores a injertación, a una planta por unidad experimental. La biomasa total de las plantas se pesó en fresco (peso húmedo) con balanza de 0,5 kg de precisión, se tomó una muestra de aproximadamente 250 g de cada una de las partes de la planta (tallo, raíz y hojas) y se secó en horno a 60°C durante 48 horas, posteriormente se estimó el peso seco total de cada parte a partir del porcentaje de humedad calculado. Las variables evaluadas para desempeño agronómico fueron: altura (cm), longitud de injerto (cm), diámetro de portainjerto (cm), número de hojas, área de copa (m²) y peso seco (g).

Las variables agronómicas estudiadas (altura y diámetro del tallo a 1 cm del suelo) en la fase de vivero, se estimaron a partir de la pendiente de regresión lineal respecto al tiempo de evaluación (17, 41, 62, 79, 104 y 123 días después de siembra), y se determinó la relación entre las variables, mediante coeficientes de correlación de Pearson. A las variables de prendimiento de injertos (% de yemas en estado latente, brote y muerto) se les verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente, y se analizaron mediante prueba de análisis de varianza (ANDEVA) y se realizó una prueba de comparación de medias, en función de los genotipos evaluados, mediante la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher ($p=0,05$). Todas las pruebas estadísticas se realizaron en el programa InfoStat versión 2018 [14].

Con las variables altura total (cm), longitud de injerto (cm), diámetro del portainjerto (cm), número de hojas y área de copa (m²) se realizó un análisis de conglomerados por el método de Ward y la distancia Euclídea; además, se ajustó un modelo lineal general mixto (MLGM) [$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$] para analizar el efecto de los factores fijos: genotipo (A: siete genotipos) y distancia de siembra (B: cuatro distancias) con medidas en el tiempo (dos muestreos: 20 y 34 meses después de siembra), y el efecto de sus interacciones (AB). El efecto de las parcelas y subparcelas asociadas a las distancias de siembra dentro de los genotipos se incluyeron como efectos aleatorios. Para las variables longitud de injerto y diámetro de copa, la varianza residual se modeló para contemplar varianzas diferentes (Heterocedasticidad, H) por muestreo y genotipo respectivamente, mientras que la correlación residual para las observaciones sucesivas realizadas sobre una misma planta (ubicada dentro de una subparcela

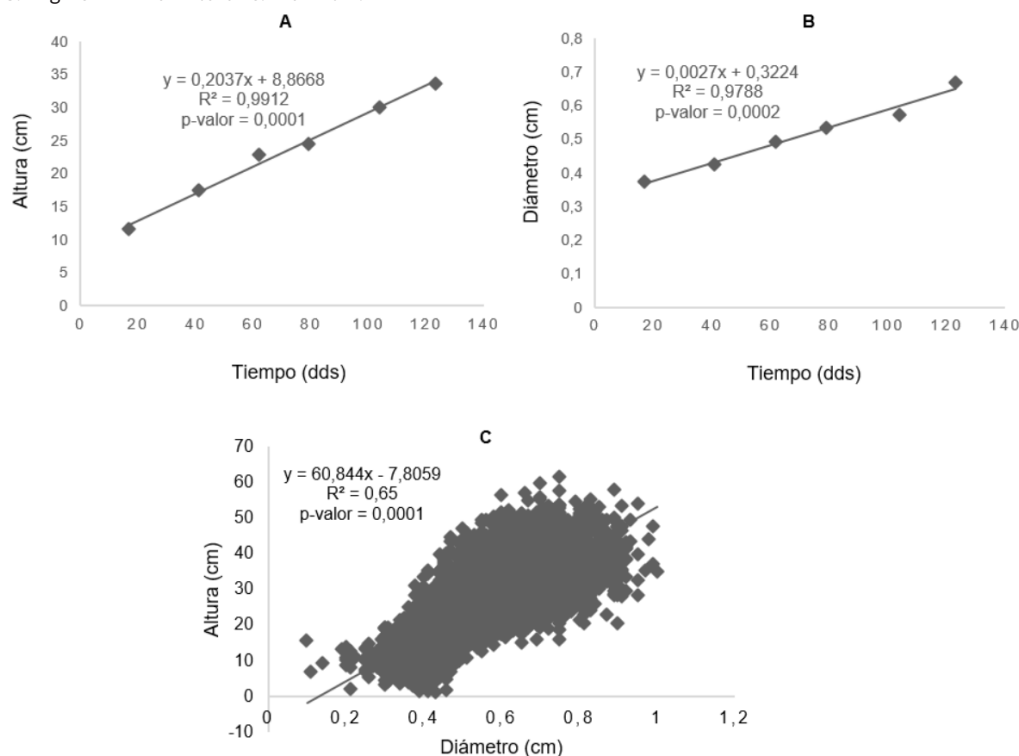
y ésta en una parcela) se examinó mediante un modelo autorregresivo de orden 1 (AR1). Los criterios de Akaike (AIC), Bayesiano (BIC) y LogLik se utilizaron para la selección de la estructura de varianzas y correlaciones residuales [15]. El análisis se realizó utilizando la función lme en el paquete nlme [16] en el software R, versión 3.4.4 [17] y utilizando la interfaz en el software Infostat v. 2018p [14]. Las diferencias entre las medias de las variables en todos los factores fijos se analizaron con la prueba LSD de Fisher con una significación de $p = 0,05$.

RESULTADOS

Crecimiento del clon IMC-67

La germinación del clon IMC-67 fue del 95%, lo cual se atribuye a varios factores entre los que se resalta la composición del sustrato, utilización de semillas pregerminadas y las condiciones óptimas del vivero. El índice de desarrollo promedio fue de $0,200 \text{ cm.día}^{-1}$ durante los 123 días después de siembra (dds), con menor valor entre los 62 y 79 dds, con un incremento de solo $0,097 \text{ cm.día}^{-1}$ y mayor entre 0 y 17 dds con un incremento de $0,680 \text{ cm.día}^{-1}$ (Figura 2A). El diámetro a 1 cm de altura, tuvo un incremento de $0,003 \text{ cm.día}^{-1}$, con mayor valor de 104 a 123 dds con $0,096 \text{ cm.día}^{-1}$ y menor valor de 79 a 104 dds con $0,037 \text{ cm.día}^{-1}$ (Figura 2B). En el clon IMC-67 se tuvo un incremento de $0,240 \text{ cm.día}^{-1}$ para la altura y de $0,002 \text{ cm.día}^{-1}$ para la circunferencia del tallo [18]; otros autores reportaron a los 90 dds un diámetro superior ($0,710 \text{ cm}$) al encontrado en este estudio ($0,580 \text{ cm}$) a los 104 dds, debido al uso de rizobacterias [19]. En la figura 2C se presenta la correlación entre las variables altura y diámetro del tallo para el clon IMC-67 en condiciones de vivero. El diámetro de la planta es importante en el desarrollo, ya que es el lugar de almacenamiento de nutrientes esenciales que darán lugar a plantas vigorosas y productivas [20].

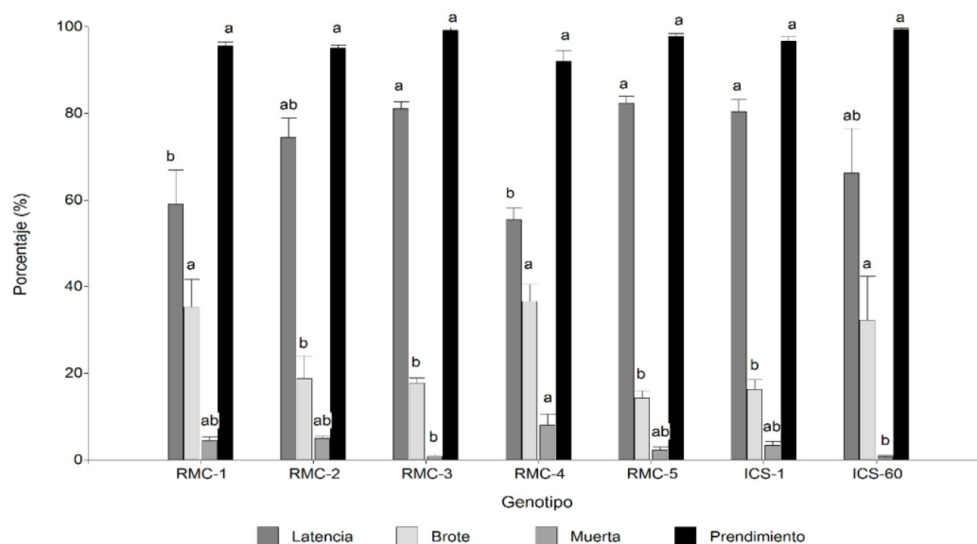
Figura 2. Crecimiento del clon de portainjerto IMC-67 bajo condiciones de vivero. A. Altura. B. Diámetro. C. Regresión lineal Altura vs. Diámetro.



Compatibilidad portainjerto-injerto

Los genotipos promisorios regionales y clones universales testigos, presentaron un porcentaje de prendimiento del 95,73%, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 3). Los resultados altos en el prendimiento de injertos están relacionados con las buenas condiciones del material vegetal empleado, y están influenciados por factores como la adecuada ejecución de los procedimientos, condiciones de la planta portainjerto, la adecuada alineación de tejidos parenquimatosos, las buenas prácticas agrícolas y la habilidad de los injertadores [21].

Figura 3. Compatibilidad de injertos para genotipos promisorios y clones universales injertados en el clon IMC-67. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según LSD Fisher ($p \geq 0,05$).



En un estudio anterior, determinaron que el porcentaje ideal de prendimiento obtenido con clones ICS-1, ICS-39, ICS-60, ICS-78, ICS-95, TSH-565, TSH-812, IMC-67, CCN-51, EET-8, SCC-59 y SCC-61, injertados mediante la técnica en parche, debe estar alrededor del 95% en portainjertos mayores de 60 días [22], lo que coincide con el presente estudio, dónde la mayoría de los genotipos presentaron prendimiento superior al 95%, lo que representa una buena compatibilidad entre el material injertado y el patronaje utilizado, sobresaliendo el clon universal de referencia ICS-60 (99,45%) y los genotipos promisorios regionales RMC-3 y RMC-5 (99,17 y 97,51%).

La variable de latencia osciló entre 55,62 y 82,83%, siendo menor en el genotipo RMC-4 y mayor en el RMC-5, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Con respecto a la mortalidad, se observó que el material RMC-4 mostró el mayor valor (7,12%) seguido por el RMC-2 (5,01%) sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), y los de menor valor fueron materiales ICS-60 y RMC-3 con 0,55 y 0,83% respectivamente. Diversos estudios permiten deducir que las diferencias en la formación de brotes en relación con la técnica de injerto, son atribuidas a los factores nutricionales y la cantidad de carbohidratos en la plántula.

Desempeño agronómico de genotipos

Las variables agronómicas a los 20 y 34 meses después de la siembra (mds), obtenidas para los factores muestreo (M), genotipos (G), distancias de siembra (DS) y las interacciones (MxG, GxDS, MxDS y MxGxDS), evidenció que para los factores M y G, las variables altura total (cm), longitud de injerto (cm), diámetro del portainjerto (cm), número de hojas y área de copa (m²), presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Por otra parte, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre distancias de siembra para la

variable diámetro del portainjerto. En cuanto a las interacciones se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en M x G para todas las variables ($p < 0,0001$), en G x DS para las variables altura total, diámetro de portainjerto y número de hojas, en M x DS para la variable longitud de injerto, y en M x G x DS para las variables diámetro de portainjerto y número de hojas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza de los efectos muestreo (M), genotipo (G), distancia de siembra (DS) y sus interacciones (MxG, GxDS, MxDS y MxGxDS), para variables agronómicas de genotipos a los 34 meses después de la siembra.

Variables*	p-valores basados en el estadístico de LSD Fisher						
	M	G	DS	M x G	G x DS	M x DS	M x G x DS
AT	<0,0001	<0,0001	0,1564	<0,0001	0,0250	0,2317	0,0757
LI	<0,0001	<0,0001	0,1219	<0,0001	0,3895	0,0434	0,0538
DP	<0,0001	<0,0001	0,0015	<0,0001	0,0002	0,3539	0,0017
NH	<0,0001	<0,0001	0,6683	<0,0001	<0,0001	0,6613	<0,0001
AC	<0,0001	<0,0001	0,1507	<0,0001	0,2168	0,2131	0,4306

*Altura total (AT), longitud de injerto (LI), diámetro del portainjerto (DP), número de hojas (NH) y área de copa (AC).

Para el factor genotipo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todas las variables para los dos momentos de evaluación, sobresaliendo en desempeño los genotipos RMC-3 y RMC-4. Los genotipos RMC-2 e ICS-60 presentaron los valores más bajos respecto a las variables evaluadas, resultando estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Con respecto al factor distancias de siembra, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las variables evaluadas entre genotipos y tiempos de muestreo, excepto para la variable número de hojas, que no presentó diferencias estadísticas significativas entre los genotipos. La distancia que tuvo mayor efecto positivo sobre las variables evaluadas fue D4 (4,0 x 4,0 m) (Cuadro 2).

El análisis de conglomerados permitió reconocer tres grupos bien diferenciados. El grupo 3 conformado por los genotipos RMC-2 (D4, D3, D2, D1), RMC-1 (D3), RMC-3 (D2), ICS-60 (D4, D3, D2, D1) y RMC-5 (D2) de bajo desempeño agronómico y con el menor número de hojas. El grupo 1 con desempeño agronómico medio y asociado a las variables diámetro de copa y diámetro de portainjerto conformado por los genotipos ICS-1 (D1, D2 y D3), RMC-4 (D1, D2, D3, D4), RMC-5 (D3, D4), RMC-3 (D1), RMC-1 (D2 y D4) y finalmente, el grupo 2 de alto rendimiento agronómico y con mayor longitud de injerto y altura total conformado por los genotipos RMC-5 (D1), RMC-1 (D1), RMC-3 (D4, D3) e ICS-1 (D4) (Figura 4).

El genotipo RMC-4, presentó los mayores valores de biomasa para las variables peso seco de hojas (PSH 610,5 g), peso seco tallo (PST 1890,6 g) y peso seco total (PSTa 2816 g), seguido de los genotipos RMC-2 (579, 1125 y 2059 g, respectivamente) e ICS-1 (400,6, 1437 y 2231 g, respectivamente), sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los menores valores de biomasa se presentaron en los genotipos RMC-1 y RMC-3, seguido de ICS-60 (Figura 5). Estos resultados guardan una relación con los resultados de las variables agronómicas, en cuanto a que los materiales RMC-4 e ICS-1 presentaron en promedio los mayores valores.

Los genotipos RMC-4 e ICS-1 tienen mayor capacidad de fijar C en su biomasa respecto a los demás materiales, lo que representa un valor agregado para los productores de cacao que los adopten en sus sistemas productivos. Los compartimentos de los sistemas agroforestales (SAF) de *T. cacao* que más carbono almacenan son: suelo (52,61%), biomasa aérea (plantas de cacao y árboles de sombra) (35,86%), raíces gruesas (7,52%), raíces finas (4,15%), necromasa (0,32%) y hojarasca (0,32%) [23]. En un estudio anterior, determinaron para sistemas agroforestales de cacao, un almacenamiento de 154,91 y 344,24 t C.ha⁻¹ a los 8 y 16 años de establecidos, respectivamente [24]. Es de mencionar que, la cantidad de C almacenado por un SAF depende de la abundancia de árboles asociados, su estructura y área basal [25].

Cuadro 2. Desempeño agronómico de genotipos promisorios y clones universales en arreglo agroforestal durante fase de establecimiento.

Factor	Nivel	Momentos ****	Altura (cm)	Longitud de copa (cm)	Diámetro de portainjerto (cm)	Número de hojas	Área de copa (m ²)
Genotipo/clon	ICS-1	1	121,23 ± 5,19*d**	100,17 ± 5,48d	1,98 ± 0,11d	81,35 ± 12,85d	1,04 ± 0,15g
		2	264,17 ± 7,33ab	232,08 ± 6,75ab	6,59 ± 0,15c	443,89 ± 18,17b	3,38 ± 0,21e
		Media***	192,70 ± 4,60a	166,12 ± 4,41a	4,29 ± 0,09b	262,62 ± 11,06ab	2,21 ± 0,13b
	ICS-60	1	83,36 ± 5,19g	58,50 ± 5,48g	1,61 ± 0,11ef	62,95 ± 12,85de	0,81 ± 0,15gh
		2	244,09 ± 7,33b	216,34 ± 6,75b	6,91 ± 0,15bc	273,90 ± 18,17c	2,16 ± 0,21f
		Media	163,72 ± 4,60c	137,42 ± 4,41c	4,26 ± 0,09b	168,43 ± 11,06c	1,48 ± 0,13c
	RMC-1	1	94,42 ± 5,19fg	69,37 ± 5,48fg	1,73 ± 0,11de	42,60 ± 12,85e	0,59 ± 0,15h
		2	253,62 ± 7,33ab	224,01 ± 6,75ab	7,11 ± 0,15ab	461,53 ± 18,17b	5,31 ± 0,21ab
		Media	174,02 ± 4,60bc	146,69 ± 4,41bc	4,42 ± 0,09ab	252,07 ± 11,06b	2,95 ± 0,13a
	RMC-2	1	88,77 ± 5,19fg	64,43 ± 5,48fg	0,77 ± 0,11g	34,10 ± 12,85e	0,57 ± 0,15h
		2	190,28 ± 7,33c	161,25 ± 6,75c	6,90 ± 0,15bc	438,78 ± 18,17b	4,46 ± 0,21cd
		Media	139,52 ± 4,60d	112,84 ± 4,41d	3,83 ± 0,09c	236,44 ± 11,06b	2,52 ± 0,13b
	RMC-3	1	123,53 ± 5,19d	100,15 ± 5,48d	1,60 ± 0,11ef	52,90 ± 12,85de	1,06 ± 0,15g
		2	262,77 ± 7,33ab	233,43 ± 6,75ab	7,48 ± 0,15a	469,23 ± 18,17b	4,99 ± 0,21bc
		Media	193,15 ± 4,60a	166,79 ± 4,41a	4,54 ± 0,09a	261,06 ± 11,06ab	3,02 ± 0,13a
	RMC-4	1	102,61 ± 5,19ef	77,36 ± 5,48ef	1,33 ± 0,11f	44,20 ± 12,85e	0,78 ± 0,15gh
		2	267,69 ± 7,33a	235,14 ± 6,75a	6,58 ± 0,15c	525,67 ± 18,17 ^a	5,72 ± 0,21a
		Media	185,15 ± 4,60ab	156,25 ± 4,41ab	3,96 ± 0,09c	284,93 ± 11,06 ^a	3,25 ± 0,13a
	RMC-5	1	114,32 ± 5,19de	89,60 ± 5,48de	1,57 ± 0,11ef	53,85 ± 12,85de	0,73 ± 0,15gh
		2	262,88 ± 7,33ab	235,89 ± 6,75a	7,29 ± 0,15ab	290,15 ± 18,17c	3,89 ± 0,21de
		Media	188,60 ± 4,60a	162,75 ± 4,41a	4,43 ± 0,09ab	172,00 ± 11,06c	2,31 ± 0,13b
Distancia de siembra	D1	1	108,78 ± 3,92b	83,40 ± 4,15b	1,64 ± 0,08d	55,30 ± 9,71b	0,86 ± 0,11c
		2	246,98 ± 5,54a	216,57 ± 5,11a	7,13 ± 0,11ab	401,82 ± 13,74 ^a	4,59 ± 0,16a
		Media	177,88 ± 3,47ab	149,99 ± 3,33ab	4,38 ± 0,07a	228,56 ± 8,36 ^a	2,72 ± 0,10a
	D2	1	96,03 ± 3,92c	71,33 ± 4,15c	1,46 ± 0,08de	49,53 ± 9,71b	0,66 ± 0,11c
		2	249,61 ± 5,54a	218,63 ± 5,11a	6,73 ± 0,11c	410,52 ± 13,74 ^a	4,18 ± 0,16ab
		Media	172,82 ± 3,47b	144,98 ± 3,33b	4,09 ± 0,07b	230,03 ± 8,36 ^a	2,42 ± 0,10b
	D3	1	103,96 ± 3,92b	80,46 ± 4,15bc	1,38 ± 0,08e	46,91 ± 9,71b	0,94 ± 0,11c
		2	242,80 ± 5,54a	216,16 ± 5,11a	6,87 ± 0,11bc	423,61 ± 13,74 ^a	4,07 ± 0,16b
		Media	173,38 ± 3,47ab	148,31 ± 3,33ab	4,13 ± 0,07b	235,26 ± 8,36 ^a	2,50 ± 0,10ab
	D4	1	107,36 ± 3,92b	84,56 ± 4,15b	1,57 ± 0,08de	60,80 ± 9,71b	0,73 ± 0,11c
		2	258,02 ± 5,54a	227,58 ± 5,11a	7,19 ± 0,11a	422,99 ± 13,74 ^a	4,25 ± 0,16ab
		Media	182,69 ± 3,47a	156,07 ± 3,33a	4,38 ± 0,07a	241,89 ± 8,36 ^a	2,49 ± 0,10ab

* Error estándar

** Valores en la columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente entre tiempos para cada nivel del factor (medias separadas por la prueba LSD, $p \geq 0,05$)

*** Medias en cada columna seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente entre niveles del factor (Prueba LSD, $p \geq 0,05$).

**** Momentos de muestreo: 1) 20 meses después de siembra, 2) 34 meses después de siembra.

Figura 4. Análisis multivariado (conglomerados método Ward y distancia Euclídea) para variables agronómicas de genotipos a diferentes distancias de siembra.

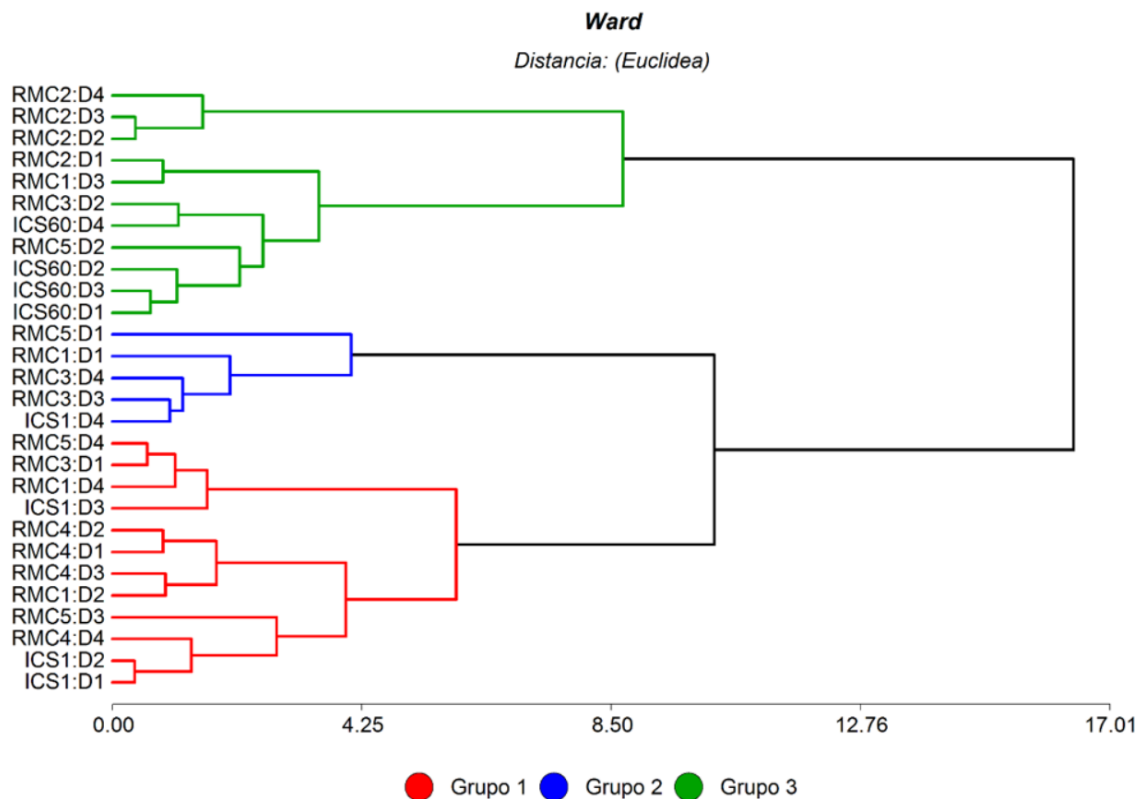
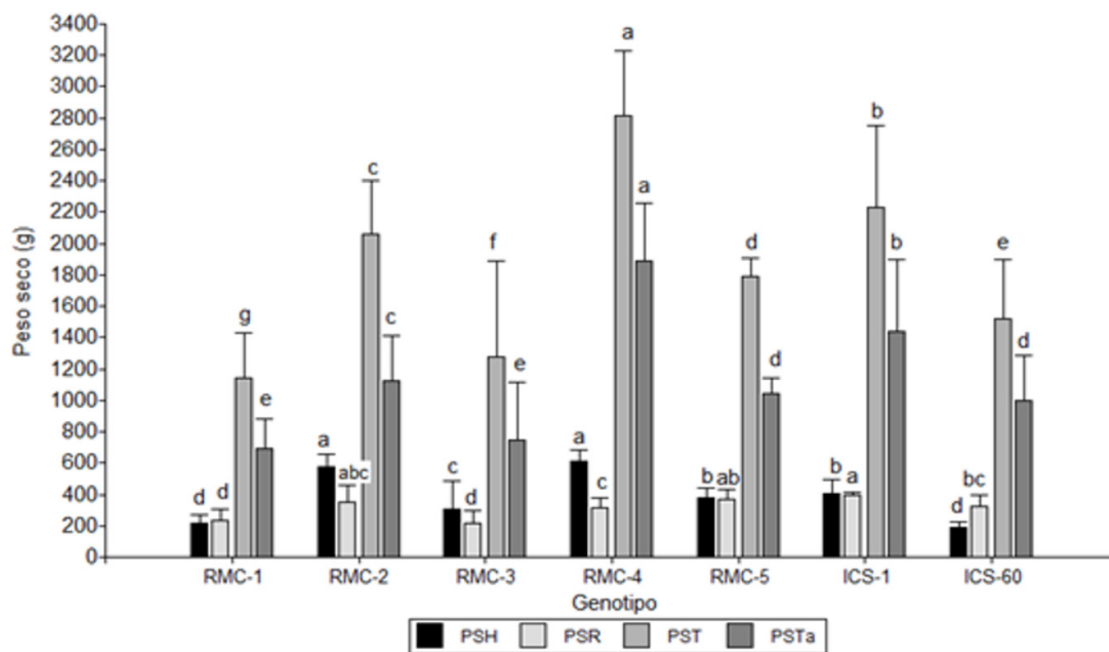


Figura 5. Producción de biomasa de genotipos establecidos en arreglo agroforestal.



CONCLUSIONES

Los genotipos promisorios de *T. cacao* evaluados representan una importante fuente de germoplasma con potencial para su consolidación como clones de rápido desarrollo y producción de biomasa en etapas tempranas de establecimiento, destacándose los genotipos RMC-3, RMC-4 y RMC-5. No obstante, el desempeño agronómico de los genotipos promisorios estuvo condicionado por la distancia de siembra, expresando su mayor potencial a distancia de 4x4 m. Finalmente, se considera necesario el desarrollo de futuros estudios que evalúen la capacidad productiva, el comportamiento fitosanitario de los genotipos promisorios y la producción de biomasa y almacenamiento de C, establecidos en las diferentes distancias de siembra.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) por la financiación del proyecto de investigación “Desempeño agronómico, evaluación fitosanitaria y caracterización molecular de clones promisorios de *Theobroma cacao* L. provenientes de materiales vegetales élite presentes en sistemas productivos del Bajo Caguán, municipio de Cartagena del Chairá”, código 1131-502-27713 y contrato 719-2011.

REFERENCIAS

- [1] RODRÍGUEZ-MEDINA, CAREN; CAICEDO-ARANA, ALVARO; SOUNIGO, OLIVIER; ARGOUT, XAVIER; ALVARADO-ALVARADO, GABRIEL; YOCKTENG, ROSANA. Cacao breeding in Colombia, past, present and future. *Breeding Science*, v. 69, n. 3, 2019, p. 373-382.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.19011>
- [2] ZARRILLO, SONIA; GAIKWAD, NILESH; LANAUD, CLAIRE; POWIS, TERRY; VIOT, CHRISTOPHER; LESUR, ISABELLE; FOUET, OLIVIER; ARGOUT, XAVIER; GUICHOUX, ERWAN; SALIN, FRANCK; SOLORZANO, REYLOD; BOUCHEZ, OLIVIER; VIGNES, HELENE; SEVERTS, PATRICK; HURTADO, JULIO; YEPEZ, ALEXANDRA; GRIVETTI, LOUIS; BLAKE, MICHAEL; VALDEZ, FRANCISCO. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Natura Ecology & Evolution*, v. 2, n. 12, 2018, p. 1879-1888.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x>
- [3] CORNEJO, OMAR E.; YEE, MU-CHING; DOMÍNGUEZ, VÍCTOR; ANDREWS, MARY; SOCKELL, ALEXANDRA; STRANDBERG, ERIKA; LIVINGSTONE III, DONALD; STACK C.; ROMERO, ALBERTO; UMAHARAN, PATHMANATHAN; ROYAERT, STEFAN; TAWARI, NILESH R.; NG, PAULINE; GUTIÉRREZ, OSMAN; PHILLIPS, WILBERT; MOCKAITIS, KEITHANNE; BUSTAMANTE, CARLOS D.; MOTAMAYOR, JUAN C. Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Communications Biology*, v. 1, n. 167, 2018, p. 1-12.
<http://10.1038/s42003-018-0168-6>
- [4] RIOS, F.; RUIZ, A.; LECARO, J.; REHPANI, C. Estrategias país para la oferta de cacaos especiales – Políticas e iniciativas privadas exitosas en el Perú, Ecuador, Colombia y República Dominicana. 1 ed. Bogotá D.C. (Colombia): Fundación Swisscontact Colombia, 2017, 140 p.
- [5] PERÚ. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO (MINAGRI). Boletín de divulgación trimestral Enero. Observatorio de commodities: cacao. Lima (Perú): 2019, 10 p.
- [6] INICIATIVA LATINOAMERICANA DEL CACAO (ILC). Reflexiones de países miembros de ILAC previo a su participación en la Conferencia Mundial del Cacao. Observatorio del cacao fino y de aroma para América Latina, 3, 2018, p. 2-3.
- [7] CÔTE D'IVOIRE. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL CACAO. Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao, tomo XLIII, n1 año cacaotero 2016/17. [on line]. 2017. Disponible: [http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/1%20-%Index-Notes-Market%20Review%20\(Eng-Fr-Sp\)-XLIII-No-1.pdf](http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/1%20-%Index-Notes-Market%20Review%20(Eng-Fr-Sp)-XLIII-No-1.pdf) [citado 4 de Enero de 2020].

- [8] CÔTE D'IVOIRE. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL CACAO. Boletín Trimestral de Estadísticas del Cacao, tomo XLII, n2 año cacaotero 2015/16. [on line]. 2016. Disponible: <http://www.icco.org/home/la-test-news.html> [citado 4 de Enero de 2020].
- [9] CELY-TORRES, LUCY-ANDREA. Oferta productiva del cacao colombiano en el posconflicto. Estrategias para el aprovechamiento de oportunidades comerciales en el marco del acuerdo comercial Colombia-Unión Europea. Equidad & Desarrollo, v. 28, 2017, p. 167-195. <https://doi.org/10.19052/ed.4211>
- [10] COLOMBIA. FONDO PARA EL FINANCIAMIENTO DEL SECTOR AGROPECUARIO (FINAGRO). Inteligencia de mercado: cacao. Bogotá (Colombia): 2018, 16 p.
- [11] RED DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN DEL SECTOR AGROPECUARIO COLOMBIANO (AGRONET). Estadísticas. Agrícola: área, producción, rendimiento y participación [on line]. 2019. Disponible: <http://www.agronet.gov.co> [citado 5 de marzo de 2020].
- [12] COLOMBIA. FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS (FEDECACAO). Boletín de prensa: pese a las adversidades el 2019 dejó cifras positivas para el sector cacaotero [on line]. 2020. Disponible: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-04-23-20-0033/1103-boletín-de-prensa-pese-a-las-adversidades-el-2019-dejo-cifras-positivas-para-el-sector-cacaotero> [citado 24 de febrero de 2020].
- [13] HOLDRIDGE, LESLIE-RENSELAER. Life zone ecology. 1 ed. San José (Costa Rica): Tropical Science Center, 1967, 206 p.
- [14] DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. InfoStat versión 2018 [online]. 2018. Disponible: <http://www.infostat.com.ar> [citado 4 de Febrero de 2020].
- [15] DI RIENZO, JULIO A.; MACCHIAVELLI, RAÚ L.; CASANOVES, FERNANDO. Modelos lineales generalizados mixtos: aplicaciones en InfoStat. 1 ed. Especial. Córdoba (Argentina): Grupo Infostat, 2017, 104 p.
- [16] PINHEIRO, JOSÉ; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. R. Core Team (2017) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R Package Version 3.1-131. [on line]. 2017. Disponible: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme> [citado 4 de Febrero de 2020].
- [17] R. CORE TEAM. R. A Language and Environment for Statistical Computing [on line]. 2018. Disponible: <https://cran.r-project.org/> [citado 4 de Enero de 2020].
- [18] SARMIENTO, SINDY-CAROLINA; GAMBOA-TABARES, JEAN-ALEXANDER; VELASQUEZ -RESTREPO, JAIME-ENRIQUE. Desempeño agronómico de tres clones de cacao en fase de vivero en la Amazonia Colombiana. Ingeniería & Amazonia, v. 4, n. 1, 2011, p. 39-47.
- [19] CORTÉS-PATIÑO, SANDRA-LUCIA; VESGA-AYALA, NELCY P.; SIGARROA-RIECHE, ALINA K.; MORENO-ROZO, LAURA; CÁRDENAS-CARO, DIANA. Sustratos inoculados con microorganismos para el desarrollo de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en etapa de vivero. Bioagro, v. 27, n. 3, 2015, p. 151-158.
- [20] ANITA-SARY, INDAH; WAHYU-SUSILO, DAN-AGUNG. Keberhasilan sambungan pada beberapa jenis batang atas dan famili batang bawah kakao (*Theobroma cacao* L.) Pelita Perkebunan, v. 28, n. 2, 2012, p. 72-81.
- [21] PALENCIA, GILDARDO; MEJÍA, LUIS A. Injertación temprana en la producción masiva de clones de cacao. 1 ed. Bucaramanga (Colombia): Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, 2004, 38 p.
- [22] PALENCIA-CALDERÓN, GILDARDO-EFRAIN; GÓMEZ-SANTOS, RAUL; GUIZA, ORLANDO. Nuevas tecnologías para instalar viveros y producir clones de cacao (*Theobroma cacao* L.). 1 ed. Bogotá D.C. (Colombia): Produmedios, 2009, 31 p.
- [23] POVEDA, VERÓNICA; OROZCO, LUIS; MEDINA, CRISTÓBAL; CERDA,ROLANDO; LÓPEZ, ARLENE. Almacenamiento de carbono en sistemas agroforestales de cacao en Waslala, Nicaragua. Agroforestería de las Américas, v. 49, 2013, p. 42-50.
- [24] ZABALA, WILFRIDO; MERINO, ERICA; PEÁLEZ, PEDRO. Influencia de tres sistemas agroforestales del cultivo de cacao en la captura y almacenamiento de carbono. Scientia Agropecuaria, v. 9, n. 4, 2018, p. 493-501. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.04>
- [25] TAGNANG-NADÈGE, MADOUNTSAP; LOUIS, ZAPFACK; CHIMI-DJOMO, CÉDRIC; LOUIS-PAUL, KABELONG-BANOHO; PREASIOUS-FUNWI, FORBI; TSOPMEJIO-TEMFACK, INGRID; VICE-CLOTEX, TAJEUKEM; NTONMEN-YONKEU, AMANDINE-FLORE; TABUE-MBOBA, ROGER-BRUNO; JULLIETE, NASANG. Carbon storage potential of cacao agroforestry systems of different age and management intensity. Climate and Development, v. 11, n. 7, 2018, p. 543-554. <https://doi.org/10.1080/17565529.2018.1456895>

Los sistemas agroforestales y la incidencia sobre el estatus hídrico en árboles de cacao*

Agroforestry systems and the incidence on water status of cacao trees

Sistemas agroflorestais e a incidência no estado hídrico em cacaueiros

ORDOÑEZ-ESPINOSA, CLAUDIA-MERCEDES¹; SUÁREZ-SALAZAR, JUAN-CARLOS²;
RANGEL-CHURIO, JESUS-ORLANDO³, SAAVEDRA-MORA, DAVID⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 14 de Junio 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Proyecto de investigación de origen: "Composición florística, estructura y servicios ecosistémicos en sistemas agroforestales con *Theobroma cacao* L. en el departamento del Huila". Financiación: Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, Sistema de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación – SENNOVA, Centro de Formación Agroindustrial – Regional Huila. Culminación: 30 de diciembre de 2018.

1 Servicio Nacional de Aprendizaje, Regional Huila, Centro de Formación Agroindustrial, Grupo de Investigación Agroindustrial. M Sc. Sistemas Sostenibles de Producción. Campoalegre, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1095-4468>

2 Universidad de la Amazonía, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroecológica, Maestría en Sistemas Sostenibles de producción, Centro de Investigaciones Amazónicas CIMAZ Macagual Cesar Augusto Estrada Gonzales, Grupo de Investigaciones Agroecosistemas y Conservación en Bosques Amazónicos- GAIA. PhD en Ciencias Biológicas. Florencia, Colombia. <http://orcid.org/0000-0001-5928-1837>

3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales, Grupo de Investigación en Biodiversidad y conservación PhD. en Biología. Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7907-9393>

4 Servicio Nacional de Aprendizaje, Regional Huila, Centro de Formación Agroindustrial, Grupo de Investigación Agroindustrial. M Sc. Agroforestería. Campoalegre, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2730-8545>

Correspondencia: cordoneze@sena.edu.co

RESUMEN

El cacao se cultiva bajo sistemas de producción como los agroforestales y libre exposición solar, su uso depende de las regiones agroecológicas donde se cultiva. El manejo del dosel de sombra incide en las condiciones microclimáticas que beneficia el comportamiento hídrico (flujo de savia V_s y potencial hídrico Ψ) de la planta de cacao. Se evaluó como la modificación del dosel de sombra (sistemas a libre exposición solar SLE y agroforestales con media M_{PAR} y baja B_{PAR} radiación transmitida) afectan el comportamiento hídrico en árboles de cacao en épocas contrastantes de precipitación. Para medir el V_s y Ψ se instalaron sensores de calor y psicrómetros de tallo en árboles de cacao tipo CCN51. Se encontró un efecto del sistema de producción y época de monitoreo sobre el V_s y Ψ en las plantas de cacao. El comportamiento del Ψ fue mayor en SLE en las dos épocas, pero se acentuó más en la época de mínima precipitación. Se encontró un comportamiento contrario en V_s , donde esta variable fue mayor en B_{PAR} durante la época de mínima precipitación. De acuerdo con los resultados obtenidos el manejo de doseles de sombra en cultivos de cacao bajo climas subóptimos incide positivamente en el estatus hídrico.

ABSTRACT

Cocoa is grown under production systems such as agroforestry and full sunlight exposition, its use depends on the agroecological regions where it is cultivated. The management of the shade canopy affects the microclimatic conditions that mainly benefit the hydric behaviour (sap flow V_s and water potential Ψ) in the cocoa plant. It was evaluated how the modification of the shade canopy (full sunlight exposition systems SLE and agroforestry with M_{PAR} medium and low B_{PAR} transmitted radiation) affects the water status of cocoa trees in contrasting periods of precipitation. For the measurement of V_s and Ψ heat sensors and stem psychrometers were installed in cocoa type CCN51 trees. An effect of the production system and monitoring season on V_s and Ψ was found in cocoa plants. The Ψ was higher in SLE in both seasons, but it was more accentuated in the period of minimum precipitation. A contrary behavior was found in V_s , since in minimum precipitation this variable was greater in B_{PAR} . According to the results obtained, the management of shade canopies in cocoa crops under suboptimal climates positively affects water status.

RESUMO

O cacau é cultivado sob diferentes sistemas de produção, como agroflorestais e exposição ao pleno sol, seu uso dependem das regiões agroecológicas onde é cultivada. O manejo do dossel de sombra tem um impacto nas condições microclimáticas

PALABRAS CLAVE:

Flujo de savia; Potencial hídrico; Disponibilidad de luz; Cobertura del dosel; cacao; agroforestales; hídrico.

KEYWORDS:

Sap flow; Water potential; Light availability; Canopy cover; cacao; Agroforestry; water.

PALAVRAS-CHAVE:

Fluxo de seiva; Potencial hídrico; Disponibilidade de luz; Cobertura do dossel; cacaueiros; agroflorestais; hídrico.

Cómo citar este artículo: ORDOÑEZ-ESPINOSA, CLAUDIA-MERCEDES; SUÁREZ-SALAZAR, JUAN-CARLOS; RANGEL-CHURIO, JESUS-ORLANDO, SAAVEDRA-MORA, DAVID. Los sistemas agroforestales y la incidencia sobre el estatus hídrico en árboles de cacao. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. 256-267. Doi: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(19\)256-267](https://doi.org/10.18684/BSAA(19)256-267)

que beneficiam principalmente o comportamento hídrico (fluxo de seiva V_s e potencial hídrico Ψ) da planta do cacau. Foi avaliado como a modificação do dossel de sombra (sistemas de exposição ao pleno sol SLE e agroflorestais com médio M_{PAR} e baixa B_{PAR} radiação transmitida) afeta o comportamento hídrico do cacau em períodos contrastantes de precipitação. Para medir V_s e Ψ sensores de calor e psicrômetros de caule foram instalados em cacauzeiros do tipo CCN51. Evidenciou-se um efeito do sistema de produção e do período de monitoramento em V_s e Ψ foi encontrado em plantas de cacau. O Ψ foi maior no SLE nos dois períodos, mas foi mais acentuado no período de precipitação mínima. No entanto, um comportamento contrário foi encontrado em V_s , pois na precipitação mínima essa variável foi maior no B_{PAR} . De acordo com os resultados obtidos, o manejo de copa de sombra em cacau em climas subótimos tem um impacto positivo no status hídrico.

INTRODUCCIÓN

El cacao se cultiva en el mundo en sitios en los cuales la precipitación varía desde 1200 hasta 4000 mm anuales [1, 2, 3] y la temperatura entre 21 y 32°C con un desempeño óptimo a nivel productivo [4]. Cuando el cultivo de cacao está expuesto a periodos prolongados de sequía se afectan de manera inmediata sus procesos fisiológicos (apertura de estomas, reducción de la fotosíntesis, metabolismo y respiración), como a largo plazo en procesos que indican en la reducción de su crecimiento y rendimiento [5, 6, 7].

Las áreas con plantaciones de cacao en el departamento del Huila están expuestas a las variaciones climáticas producto del cambio climático [8, 9] debido a periodos prolongados de eventos globales como El Niño y La Niña [10], que aumenta la temperatura entre 1,4–4,8°C [11], generan cambios en los patrones de lluvias y regímenes de precipitación [12], y reducen la productividad [13]. La sensibilidad de las plantas de cacao al déficit hídrico se debe principalmente a características morfo lógicas de sus hojas, al presentar variaciones de área foliar que están relacionadas con la transpiración [14]; los vasos del xilema tienen mayor diámetro comparado con aquellas plantas que se encuentran en un estatus hídrico adecuado, y debido a este estrés las raíces se concentran entre 0,4–0,8 m de profundidad, que limita la absorción de agua en el suelo [15] y pueden aumentar la sensibilidad del cacao a la cavitación en periodos de sequía [16]. Si el aporte hídrico del suelo está por debajo del requerimiento hídrico estimado del árbol (1400–2000 mm/año) se verá afectado el proceso de floración (reducción en la tasa de producción de flores y el cuajado) [11], que influyen en el rendimiento del grano [13].

Actualmente en Colombia el cacao es cultivado en cuatro regiones agroecológicas: departamentos de Santander y Norte de Santander (altitudes entre 300 y 1200 msnm, precipitación entre 1500 y 2500 mm/año, temperatura entre 23 y 28°C), departamentos del eje cafetero, Caldas, Quindío, Risaralda, Antioquia, Santander, Norte del Tolima, Boyacá (altitudes entre 500 y 1200 msnm, precipitación entre 1500 y 2000 mm/año, temperatura entre 23 y 26°C), Arauca, Meta, Urabá y Bajo Cauca (altitudes entre 0 y 500 msnm, precipitación > 2500 mm/año, temperatura entre 26 y 30°C), Huila, Cauca, Valle del Cauca, Tolima, Costa Atlántica (altitudes entre 0 y 500 msnm, precipitación < 1500 mm/año, temperatura entre 26 y 30°C), pero estas regiones presentan condiciones de precipitación contrastantes (<1200 mm hasta 4000 mm anuales) [17].

Algunas de estas regiones no presentan restricciones en clima y suelo que afecten el rendimiento del grano de manera importante (suelo profundos > 100 cm, bien drenados, temperatura entre 24 y 28°C y precipitación anual entre 1800 y 2600 mm/año que garantizan las necesidades hídricas del cultivo), pero cultivos de cacao ubicados en Valles interandinos secos presentan restricciones en disponibilidad de agua con precipitaciones anuales < 1200 mm que pueden ser no aptas para la producción de cacao [13].

En el departamento del Huila la actividad cacaotera se concentra en 10 municipios, con mayor producción en Campoalegre, Rivera, Algeciras y Hobo. Esta región se caracteriza por condiciones de bosque seco tropical, con precipitaciones que varían entre 668 mm y 1500 mm anuales, una marcada estacionalidad de lluvias de una época seca larga (Julio, Agosto y Septiembre) y seca corta (Enero y Febrero), alta radiación solar mensual (1498,2 micromol m²/s) y brillo solar (6 horas de sol/día) que pueden incidir en el uso de agua por las plantas de cacao, en respuesta a las condiciones ambientales [18].

Estas fluctuaciones del clima han motivado a los productores a implementar diferentes arreglos agroforestales con el cultivo de cacao [19, 20], como una estrategia de adaptación a condiciones subóptimas o adversas en los periodos secos que favorezca la producción del grano, advirtiendo que existe un efecto del tipo de árbol sobre las estrategias de adaptación [21].

Los cultivos de cacao asociado con diversas especies de árboles producen condiciones de sombra que permitan un adecuado desarrollo del cultivo y buen desempeño fisiológico de la planta, aprovechando su condición umbrófila (tolerante a la sombra) [22]. Se han implementado sistemas de riego debido a la alta radiación y demanda hídrica, pero por sus altos costos de producción solo se ha implementado en el 0,5% del área cultivada [23, 24].

De acuerdo a esta situación, los sistemas agroforestales se convierten en una estrategia de adaptación a las condiciones hídricas limitantes especialmente por la alta radiación durante las épocas secas para la producción de cacao. El rol de los SAF para el mantenimiento del estatus hídrico en los árboles de cacao radica en la modificación de las condiciones microclimáticas lo cual incide notablemente en la transpiración.

El potencial hídrico es el trabajo necesario para llevar el agua ligada al nivel del potencial de agua pura ($MPa = 0$) a una misma temperatura y presión atmosférica [25]. Esta variable influye en el crecimiento celular, la fotosíntesis y la productividad de los cultivos, y es un indicador del estado hídrico del cultivo [26]. El monitoreo del flujo de savia (V_s) y del potencial hídrico del xilema (Ψ MPa) en las especies arbóreas permite estimar la transpiración [27] y entender las respuestas específicas de la planta a la variación de los parámetros ambientales, la disponibilidad de agua y luz [28, 29], para proponer el desarrollo de sistemas de producción estables [30].

Con base en este escenario es necesario desarrollar estudios cuantitativos sobre la respuesta de las plantas de cacao (productividad) al déficit hídrico y maneras de mitigación de los efectos adversos [1, 21]. El objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de la cobertura arbórea sobre el estatus hídrico (dinámica del flujo de savia y potencial hídrico) en árboles de cacao *Theobroma cacao* L. en el valle interandino del norte del Huila.

MÉTODO

La investigación se realizó en el municipio de Campoalegre, Huila, (Colombia) en una finca ubicada a $2^{\circ} 40' 30,2''$ N y $75^{\circ} 21' 24,6''$ W, 533 msnm, temperatura promedio anual de $25,6^{\circ}C$, humedad relativa promedio anual de 68%, brillo solar de 1679 horas/año y promedio de 6 horas de sol día; que corresponde a una zona de bosque seco tropical en la región fisiográfica del valle superior del río Magdalena. El régimen de lluvias es bimodal, con una precipitación media anual 1370 mm con dos picos de lluvia: marzo-mayo y octubre a noviembre.

Sistemas de producción cacaoteros

Se utilizaron cultivos en estado productivo de cacao clonados con el genotipo CCN51 que tenían un marco de siembra 3×3 m, edad promedio de plantación de 8 años, caracterizados por los siguientes sistemas de producción i. a libre exposición solar (SLE) y ii. bajo sistemas agroforestales (SAF). Para los cultivos bajo SAF se experimentaron dos opciones: i. con dominio de frutales (*Annona muricata*, *Morinda citrifolia*, *Psidium guajava*), niveles de radiación transmitida baja (B_{PAR}), dosel del 66% de apertura, un índice de área foliar promedio de 2,3 y una densidad de árboles frutales de 103 árboles en 0,01 ha ii. con dominio de especies vegetales maderables (*Ochroma pyramidale*, *Cordia alliodora*, *Cecropia peltata* y *Guarea guidonia*), radiación transmitida media (M_{PAR}), apertura de dosel de 22%, un índice de área foliar promedio de 3,1 y una densidad de árboles maderables de 12 árboles en 0,01 ha.

Las condiciones de clima y suelo fueron homogéneas para las parcelas de los sistemas de producción evaluados ya que se encontraban en la misma finca, una seguida de la otra.

Medición del flujo de savia y potencial hídrico

El flujo de savia (V_s) fue determinado utilizando sensores tipo SFM1 (ICT International, Armidale, Australia), instalados en el tronco principal de tres árboles de cacao en cada parcela ($n=9$), a 15 cm de altura del suelo. Cada sensor SFM1, está conformado por un sistema de recolección de datos (CR10X datalogger + multiplexor AM416, Campbell Scientific, Logan, UT, USA), programado para almacenar los datos cada diez minutos y posteriormente la información semanalmente en el Software ICT HRM (Versión: 2.0.5.4). Los sensores SFM1 se fundamentan en el método de relación de calor (Heat Ratio Method, HRM) [31]. En el tronco de cada árbol de cacao se instalaron dos agujas y una sonda de calor integrada a un microprocesador para determinar la velocidad del flujo de savia. Cada aguja está compuesta por dos termocuplas las cuales reciben el pulso de calor que incrementa la temperatura en el xilema conductor y es proporcional a la velocidad del pulso de calor (V_s /cm/h) [31, 32].

La V_s , se estimó utilizando la ecuación 1.

$$V_s = \frac{K}{x} \ln(T_1/T_2) \times 3600 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

K = Difusividad térmica en el área del xilema conductor (se asumió un valor por defecto de 0,0025 cm²/s).

x = Distancia entre la sonda de calor y cada una de las agujas (cm).

T = Aumento de la temperatura (°C) inicial con respecto a la aguja ubicada en la parte

inferior (T_1) y superior (T_2).

Para determinar el potencial hídrico del xilema (Ψ , Mpa) se utilizaron psicrómetros de tallo PSY (ICT International, Armidale, Australia) instalados a la misma altura del suelo del tronco principal del árbol donde se ubicaron los sensores tipo SFM1. Para el registro y almacenamiento de datos se instaló a cada psicrómetro un "datalogger" Em-50 (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA), con frecuencia de registro de diez minutos. Los datos registrados fueron descargados cada semana en el Software PSY1 ICT (Versión: 2.0.5.9). El Ψ Mpa se calculó según lo propuesto por [33].

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en dos temporadas contrastantes de precipitación (época de máxima precipitación: del 17 de marzo al 13 de Abril del 2017 y época de mínima precipitación: del 21 de Septiembre al 11 de Octubre de 2017), de flujo de savia y potencial hídrico fueron analizadas ajustando modelos lineales mixtos (MLM) para estudiar el efecto de los factores fijos (i. sistema de producción, ii. Época y iii. Hora). Se incluyeron como efectos aleatorios el día y las repeticiones de los árboles de cacao. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza se evaluaron mediante un análisis residual exploratorio. Las diferencias entre los sistemas de producción se analizaron con la prueba post-hoc de LSD de Fisher con una significación de $\alpha = 0,05$. El MLM se realizó utilizando la función lme en el paquete nlme y las gráficas fueron realiza utilizando el paquete "ggplot2" el software de lenguaje R, versión 3.4.4 (R Development Core Team, 2020), por la interfaz en InfoStat [34].

RESULTADOS

Potencial hídrico

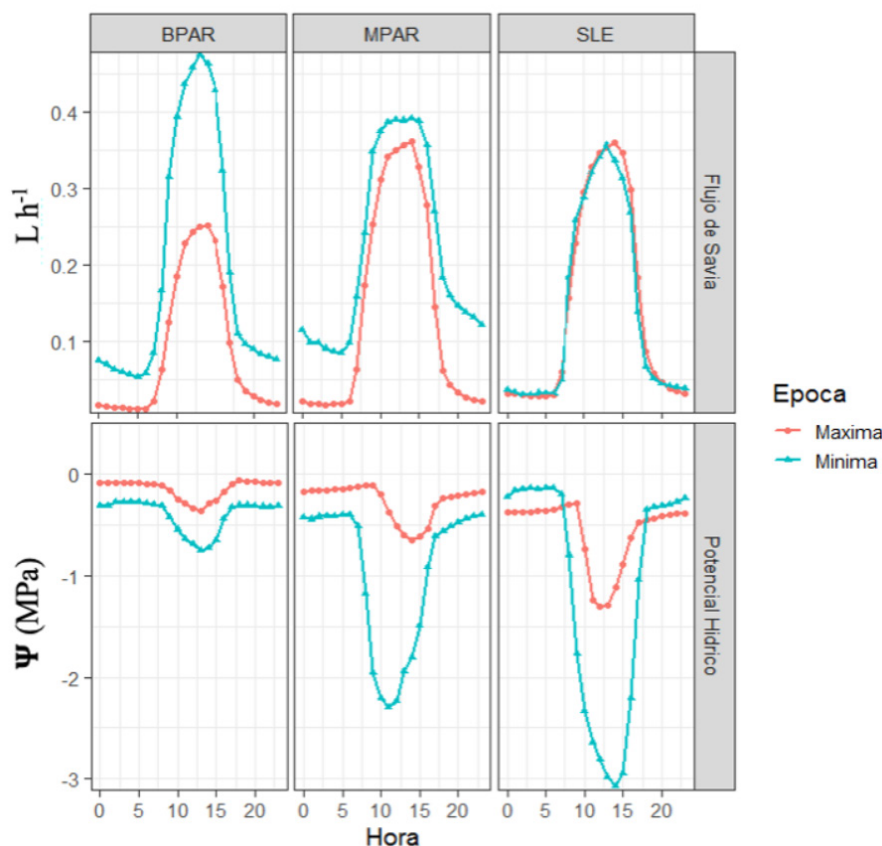
Al comparar el gradiente del potencial hídrico del xilema conductor (Ψ), este fue mayor en el cultivo a libre exposición solar (SLE) en las dos épocas de monitoreo pero se acentuó más en la época seca cuando muestra valores de $-3,08 \pm 0,1$ Mpa. En los sistemas agroforestales (SAF) con maderables con medio nivel de radiación transmitida (M_{PAR}) el valor fue intermedio ($-2,29 \pm 0,1$ Mpa), seguido del SAF con frutales con nivel de radiación transmitida baja (B_{PAR}) que registró el menor valor de potencial hídrico durante la misma época ($-0,75 \pm 0,1$ Mpa).

Flujo de savia

En el flujo de savia (V_s) hay un comportamiento diferente en las dos épocas climáticas en el caso de SAF con frutales (B_{PAR}). En la época seca se alcanza el valor extremo entre las 10 y las 15 horas. En el SAF con maderables (M_{PAR}) las curvas muestran el mismo patrón y en algunos momentos del día se presentan diferencias significativas ($P < 0,005$). En el cultivo a libre exposición solar (SLE) el comportamiento es muy parecido en las dos épocas a lo largo del día.

Se evidencia en la Figura 1, como el flujo de savia en el SAF con frutales (B_{PAR}) durante la época de mínima precipitación tiene el mayor valor ($0,5 \text{ L h}^{-1}$) a las 12 horas, seguido del SAF con maderables (M_{PAR}) ($0,38 \text{ L h}^{-1}$) entre las 10 y las 18 horas, frente al cultivo a libre exposición solar (SLE) con un menor valor ($0,35 \text{ L h}^{-1}$) entre las 12 horas.

Figura 1. Comportamiento del flujo de savia (V_s) y del potencial hídrico (Ψ , Mpa) en árboles de cacao en SLE y SAF (B_{PAR} con frutales y M_{PAR} con maderables), en máxima y mínima precipitación.



Flujo de savia y potencial hídrico

Los valores del potencial hídrico (Ψ) se correlacionan de manera negativa con el flujo de savia (V_s $r = -0,65$ $P < 0,001$). En la Figura 1, se observa un comportamiento opuesto entre el potencial hídrico (Ψ) y el flujo de savia (V_s), entre los sistemas de producción, durante la época seca. En las dos variables (Ψ y V_s) el SAF con frutales (B_{PAR}) muestra el menor potencial hídrico y mayor flujo de savia, seguido del SAF con maderables (M_{PAR}) y con los menores valores en el sistema de producción a libre exposición solar (SLE).

En la época de máxima precipitación el mayor flujo de savia se observa en el sistema de producción a libre exposición solar (SLE) y el SAF con maderables (M_{PAR}) ($0,36 \pm 0,1 \text{ L h}^{-1}$), con un menor valor en el SAF con frutales (B_{PAR}) ($0,25 \text{ L h}^{-1}$), pero el potencial hídrico no tuvo el mismo comportamiento, siendo estadísticamente menor en el SAF (B_{PAR}) ($-0,3 \pm 0,1 \text{ Mpa}$), seguido del SAF (M_{PAR}) ($-0,6 \pm 0,1 \text{ Mpa}$) y el máximo valor en el cultivo a libre exposición solar (SLE) ($-1,5 \pm 0,1 \text{ Mpa}$) ($P < 0,01$ Figura 1).

Los resultados descritos sobre el comportamiento del flujo de savia (V_s) durante la presente investigación, son similares a los descritos por otros estudios [18, 22]. Las condiciones que probablemente pueden incidir sobre el comportamiento del estatus hídrico puede ser la variabilidad climática o la variación interanual [35, 36, 37] que ocasiona una alta demanda evaporativa [38] causando el cierre estomático. Estas situaciones han sido descritas en otros estudios específicamente para el cultivo del cacao [18, 38] en los cuales mencionan que V_s depende de los incrementos de la radiación y del déficit de vapor de presión. Esto indica el efecto del dosel de sombra sobre procesos de apertura y cierre estomático lo cual se refleja en la dinámica de V_s [38].

Para el caso del comportamiento del Ψ que se encontró durante la investigación, se puede relacionar con una respuesta fisiológica de la planta a la disponibilidad de agua en el suelo y su distribución en la planta [22] que es limitada por variables atmosféricas [15, 18], específicamente para la época de mínima precipitación. La disminución del agua en la zona de raíces implica ejercer una mayor presión para movilizar el agua desde gradientes diferenciales de presión en el complejo suelo-planta-atmósfera [39, 40, 41, 42]. La transpiración excesiva se controla por los estomas; se evitan daños de embolia [43, 44], aunque se reducen la fotosíntesis y el rendimiento (producción) de la planta, causados por la sequía [45]. Se podría considerar que a partir de nuestros resultados probablemente las plantas de cacao tienen un compartimiento isohídrico debido a que cierran sus estomas y se presenta una caída en el potencial hídrico del suelo, es importante advertir que en nuestro estudio el genotipo evaluado es el CCN 51, ya que se ha mencionado que el genotipo puede incidir [46].

Bajo estas condiciones las plantas de cacao en el sistema a libre exposición solar (SLE) durante la época de mínima precipitación, pudieron presentar un estrés hídrico severo (potencial hídrico $< -1,76 \text{ Mpa}$) [47], por la sensibilidad de la especie al déficit hídrico [8]. El mecanismo de las plantas ante el déficit hídrico en los tres sistemas de producción analizados refleja la pérdida de agua de los tejidos del tallo durante la mañana y una recuperación nocturna, exhibiendo una fase opuesta al flujo de savia, estos cambios están estrechamente relacionados con factores climáticos [48, 43, 49, 50, 41] en árboles perennes en el trópico [39].

Los valores de potencial hídrico ($-0,4$ hasta $-0,75 \text{ Mpa}$) encontrados en el SAF con frutales (B_{PAR}) durante las dos épocas evaluadas fueron menores a 1 MPa que fisiológicamente indican un estrés hídrico moderado [47]. Esta acción se relaciona con la influencia del dosel sobre el microclima que permite reducir la evapotranspiración comparada con la situación a libre exposición solar [22]. Los resultados hallados comprueban que la cobertura arbórea de los árboles asociados con cacao en Sistemas Agroforestales (SAF), reduce el estrés hídrico, favorece el balance hídrico del cultivo [52], el flujo de savia y en consecuencia mejorar los procesos fotosintéticos y el rendimiento del cultivo [8, 9] en épocas de mínima precipitación.

CONCLUSIONES

La tendencia del flujo de savia (V_s) durante el día en los periodos contrastantes de precipitación siguió un patrón similar tanto B_{PAR} y M_{PAR} , comparado con SLE. Al comparar las épocas se evidencia que el V_s fue mayor en la época seca (mínima precipitación) con una magnitud de $0,5 \text{ L h}^{-1}$ bajo el SAF con frutales el cual tenía un bajo nivel de radiación transmitida (B_{PAR}). Sin embargo en el sistema a libre exposición solar (SLE) el comportamiento del V_s no fue estadísticamente diferente.

El potencial hídrico (Ψ) mostró los valores más altos ($-0,75$, $-2,29$ y $-3,08 \text{ MPa}$) durante la época seca en los tres arreglos, pero la mayor magnitud se presentó bajo el sistemas a libre exposición solar (SLE), seguida por la condición SAF maderables con radiación transmitida media (M_{PAR}) y por los SAF con frutales con nivel de radiación transmitida baja (B_{PAR}), donde las variaciones entre las épocas climáticas no son tan extremas.

Los resultados evidencian un efecto positivo de los SAF sobre el estatus hídrico en el cultivo de cacao durante las dos épocas evaluadas, porque mejoran las condiciones microclimáticas que favorecen el balance hídrico del cultivo y reducen el estrés hídrico para que no se limite el flujo de savia, la fotosíntesis y por ende el rendimiento del cultivo. Además de estas los servicio ecosistémicos directos, que convierten los SAF en una estrategia adecuada de adaptación al cambio climático por enriquecer y mantener la biodiversidad asociada a las áreas con plantaciones de cacao.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento del Huila por apoyar la formación Doctoral, al SENA Regional Huila, a la Universidad de la Amazonía y la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

- [1] CARR, M.K.V.; LOCKWOOD, G. The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma cacao* L.) a review. *Experimental Agriculture* v. 47, n. 04, 2011, p. 653-676.
<https://doi.org/10.1017/S0014479711000421>
- [2] SUÁREZ-SALAZAR, JUAN-CARLOS. Comportamiento ecofisiológico de *Theobroma cacao* L. en diferentes arreglos agroforestales bajo condiciones de la Amazonia Colombiana [Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, 2018, 147 p.
- [3] HEBBAR, K.B.; APSHARA, ELAIN; CHANDRAN, K.P; PRASAD,VARA. Effect of elevated CO_2 , high temperature, and water deficit on growth, photosynthesis, and whole plant water use efficiency of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *International Journal of Biometeorology*, v. 64, n. 1, 2020, p. 47-57.
<https://doi.org/10.1007/s00484-019-01792-0>
- [4] JANANI, P; KUMAR, N.; JEGADEESWARI, V. Evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones under natural rainfed conditions for drought tolerance. *Chemical Science Review and Letters*, v. 8, n. 32, 2019, p. 220-225.
- [5] JANANI, P; KUMAR, N.; JEGADEESWARI, V. Dynamics of gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters of cocoa genotypes in response to water deficit. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 8, n. 6, 2019, p. 415-419
- [6] KUNIKULLAYA, AMITHA; SURESH, J.; BALAKRISHNAN, S.; KUMAR, M.; JEYAKUMAR, P; KUMARAVADIVEL, N.; JEGADEESWARI, V. Effect of water stress on photosynthetic parameters of cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *International Journal of Chemical Studies*, v. 6, n. 6, 2018, p. 1021-1025.
- [7] ACHEAMPONG, K.; DAYMOND, A.J.; ADU-YEBOAH, P; HADLEY, P. Improving field establishment of cocoa (*Theobroma cacao*) through mulching, irrigation and shading. *Experimental Agriculture*, v. 56, n. 6, 2019, p. 898-912.
<http://10.1017/S0014479718000479>

- [8] NIETHER, WIEBKE; SCHNEIDEWIND, ULF; ARMENGOT, LAURA; ADAMTEY, NOH; SCHNEIDER, MONIKA; GEROLD, GERHARD. Spatial-temporal soil moisture dynamics under different cocoa production systems. *Catena* v. 158, 2017, p. 340-349.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.07.011>
- [9] GATEAU-REY, LAURANNE; TANNER, EDMUND; RAPIDEL, BRUNO; MARELLI, JEAN-PHILIPPE; ROYAERT, STEFAN. Climate change could threaten cocoa production: Effects of 2015-16 El Niño-related drought on cocoa agroforests in Bahia, Brazil. *PLoS ONE*, v. 13, n. 7, 2018, e0200454.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200454>
- [10] SMITH, SARAH C.; UBILAVA, DAVID. The El Niño Southern Oscillation and economic growth in the developing World. *Global Environmental Change* v. 45, 2017, p. 151-164.
<https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2017.05.007>
- [11] LAHIVE, FIONA; HADLEY, PAUL; DAYMOND, ANDREW J. The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 39, n. 5, 2019.
<https://doi.org/10.1007/s13593-018-0552-0>
- [12] BECA, KERSTIN; KREYLING, JUERGEN; BEIERKUHNLEIN, CARL; JENTSCH, ANKE. Importance of Seasonality for the Response of a Mesic Temperate Grassland to Increased Precipitation Variability and Warming. *Ecosystems*, v.20, 2017, p. 1454-1467.
<https://doi.org/10.1007/s10021-017-0122-3>
- [13] MEDINA, V.; LALIBERTE, B. A review of research on the effects of drought and temperature stress and increased CO₂ on *Theobroma cacao* L, and the role of genetic diversity to address climate change. San José (Costa Rica): Bioversity International, v. 51, 2017, p. 1-59.
- [14] DE ALMEIDA, JENNY; TEZARA, WILMER; HERRERA, ANA. Respuestas fisiológicas a la sequía y el déficit de agua experimental y el anegamiento de cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao* L) seleccionados para el cultivo en Venezuela. *Agricultural Water Management* v. 171, 2016, p. 80-88.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.03.012>
- [15] MOSER, G.; LEUSCHNER, C.; HERTEL, D.; HÖLSCHER, D.; KÖHLER, M.; LEITNER, D.; MICHALZIK, B.; PRIHASTANTI, E.; TJITROSEMITO, S.; SCHWENDENMANN, L. Response of cocoa trees (*Theobroma cacao*) to a 13-month desiccation period in Sulawesi, Indonesia. *Agroforestry Systems*, v. 79, n. 2, 2010, p. 171-187.
<https://doi.org/10.1007/s10457-010-9303-1>
- [16] KOTOWSKA, MARTYNA M.; HERTEL, DIETRICH; RAJAB, YASMIN-ABOUT; BARUS, HENRY; SCHULDT, BERNHARD. Patterns in hydraulic architecture from roots to branches in six tropical tree species from cacao agroforestry and their relation to wood density and stem growth. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 2015, p. 1-16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00191>
- [17] QUINTANA-FUENTES, LUCAS-FERNANDO; GARCÍA-JEREZ, ALBERTO; MORENO-MARTÍNEZ, EDITH. Perfil sensorial de cuatro modelos de siembra de cacao en Colombia. *Entramado*, v. 14, n. 2, 2018, p. 256-268.
<http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.4756>
- [18] KÖHLER, MICHAEL; HANF, ANDREA; BARUS, HENRY; HÖLSCHER, DIRK. Cacao trees under different shade tree shelter: effects on water use. *Agroforestry systems*, v. 88, n. 1, 2014, p. 63-73.
<https://doi.org/10.1007/s10457-013-9656-3>
- [19] NIETHER, WIEBKE; ARMENGOT, LAURA; ANDRES, CRISTIANO; SCHNEIDER, MONIKA; GEROLD, GERHARD. Shade trees and tree pruning alter throughfall and microclimate in cocoa (*Theobroma cacao* L.) production systems. *Annals of forest science*, v. 75, n. 38, 2018, p. 1-16.
<https://doi.org/10.1007/s13595-018-0723-9>
- [20] BORDEN, KIRA A.; ANGLAAERE, LUKE; OWUSU, SANDRA; MARTIN, ADAM; BUCHANAN, SERRA W.; ADDO-DANSO, SHALOM D.; ISAAC, MARNEYE. Soil texture moderates root functional traits in agroforestry systems across a climatic gradient. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 295, 2020, p. 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106915>

- [21] ABDULAI, ISSAKA; VAAST, PILIPPE; HOFFMANN, MUNIR P.; ASARE, RICHARD; JASSOGNE, LAURENCE; VAN-ASTEN, PIEN; RÖTTER, REIMUND; GRAEFE, SOPHIE. Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. *Global change biology*, v. 24, n. 1, 2018, p. 273-286. <https://doi.org/10.1111/gcb.13885>
- [22] JIMÉNEZ-PÉREZ, ALFREDO; CACH-PÉREZ, MANUEL; VALDEZ-HERNÁNDEZ, MIRNA; DE LA ROSA-MANZANO, EDILIA. Effect of canopy management in the water status of cacao (*Theobroma cacao*) and the microclimate within the crop area. *Botanical Sciences*, v. 97, n. 4, 2019, p. 701-710. <https://doi.org/10.17129/botsci.2256>
- [23] MENESES-BUITRAGO, DIEGO-HERNÁN; BOLAÑOS-BENAVIDES, MARTHA-MARINA; GÓMEZ-GIL, LUIS-FERNANDO; RAMOS-ZAMBRANO, HOUSSEMAN-STEVEN. Evaluation of irrigation and pruning on the phenology and yield of *Theobroma cacao* L. *Agronomía Mesoamericana*, v. 30, n. 3, 2019, p. 681-693. <http://10.15517/am.v30i3.36307>
- [24] BUNN, C.; FERNANDEZ-KOLB, P.; ASARE, R.; LUNDY, M. Climate Smart Cocoa in Ghana Towards climate resilient production at scale. CCAFS Info Note. CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS) [online]. 2019. Disponible: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/103770> [citado 22 de Mayo de 2020].
- [25] MELGAREJO, LUZ-MARINA; HERNÁNDEZ, SOLEDAD; BARRERA, JAIME; SOLARTE, MARIA-ELENA.; SUAREZ, DIEGO.; PEREZ, LAURA-VICTORIA.; ROJAS, YADIRA-ANDREA; CRUZ-AGUILAR, MARISOL; MORENO-ALVAREZ, LEONARDO-GUILLERMO; CRESPO, SANDRA; PÉREZ, WALTER. Experimentos en fisiología vegetal. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2010, p. 137-167. Disponible: http://bdigital.unal.edu.co/8545/2/02_Preliminares.pdf
- [26] FERREYRA, RAUL; SELLES, GABRIEL L.; MALDONADO, PATRICIO; CELEDÓN, JOSÉ; GIL, P. Efecto del Clima, de las Características de la Hoja y de la Metodología de Medición en el Potencial Hídrico Xilemático en Palto (*Persea americana* Mill.). *Agricultura Técnica*, v. 67, n. 2, 2007, p. 182-188.
- [27] CASSIANI, G.; BOAGA, J.; VANELLA, D.; PERRI, M.T.; CONSOLI, S. Monitoring and modelling of soil-plant interactions: the joint use of ERT, sap flow and eddy covariance data to characterize the volume of an orange tree root zone. *Hydrology and Earth System Sciences*, v. 19, n. 5, 2015, p. 2213-2225.
- [28] MINER, GRACE-LLOYD; HAM, JAY M.; KLUITENBERG, GERARD L. A heat-pulse method for measuring sap flow in corn and sunflower using 3D-printed sensor bodies and low-cost electronics. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 246, 2017, p. 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.06.012>
- [29] EPILA, JAKIE; MAES, WOUTER H.; VERBEECK, HANS; VAN-CAMP, JANNE; LAMORIS-OKULLO, JOHN-BOSCO; STEPPE, KATHY. Plant measurements on African tropical *Maesopsis eminii* seedlings contradict pioneering water use behaviour. *Environmental and experimental botany*, v. 1, n. 35, 2017, p. 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.12.006>
- [30] SHUAL, FU; SUN, LI; LUO, YI. Canopy conductance and stand transpiration of *Populus simonii* Carr in response to soil and atmospheric water deficits in farmland shelterbelt, Northwest China. *Agroforestry Systems*, v. 91, n. 6, 2016, p. 1165-1180. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-0002-4>
- [31] BURGESS, STHEPE; ADAMS, MARK; TURNER, NEIL C.; BEVERLY, CRAIG R.; ONG, CHIN K.; KHAN, AHMED A.; BLEBY, TIM M. An improved heat pulse method to measure low and reverse rates of sap flow in woody plants. *Tree Physiology*, v. 21, 2001, p. 589-598. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.9.589>
- [32] BURGESS, STHEPEN; ADAMS, MARK; TURNER, NEIL C.; ONG, CHIN K. The redistribution soil water by tree root systems. *Oecologia* v. 15, 1998, p. 306-311. <https://doi.org/10.1007/s004420050521>
- [33] DIXON, MIKE; DOWNEY, ALEC. PSY1 Stem Psychrometer Manual. ICT International [online]. 2013. Disponible: <http://www.ictinternational.com/content/uploads/2014/03/PSY1-manual-ver-4.7.pdf> [citado 2 de Mayo de 2020].

- [34] DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. In: InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [online]. 2017. Disponible: <http://www.infostat.com.ar> [citado 8 de mayo de 2020].
- [35] ZHAO, CHUNYAN; SI, JIAN-HUA; FENG, QI; YU, TENGFEY; LI, PEIDU. Comparative study of daytime and nighttime sap flow of *Populus euphratica*. *Plant Growth Regulation*, v. 82, n. 2, 2017, p. 353-362. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0263-6>
- [36] XIA, J.B.; ZHAO, Z.G.; SUN, J.K.; LIU, J.T.; ZHAO, Y.Y. Response of stem sap flow and leaf photosynthesis in *Tamarix chinensis* to soil moisture in the Yellow River Delta, China. *Photosynthetica*, v. 55, 2017, p. 368-377. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0651-6>
- [37] QIU-YUE, HE; MEI-JIE, YAN; MIYAZAWA, YOSHIYUKI; QIU-WEN, CHEN; RAN-RAN, CHENG; KYOICHI, OTSUKI; NORIKAZU, YAMANAKA.; SHENG, DU. Sap flow changes and climatic responses over multiple-year treatment of rainfall exclusion in a sub-humid black locust plantation. *Forest Ecology and Management*, v. 457, 117730, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117730>
- [38] KÖHLER, MICHAEL; DIERICK, DIEGO; SCHWENDENMANN, LUITGARD; HÖLSCHER, DIRK. Water use characteristics of cacao and Gliricidia trees in an agroforest in Central Sulawesi, Indonesia. *Ecohydrology: Ecosystems, Land and Water Process Interactions, Ecohydrogeomorphology*, v. 2, n. 4, 2009, p. 520-529. <https://doi.org/10.1002/eco.67>
- [39] LUO, ZINDONG; GUAN, HUADE; ZHANG, XINPING; ZHANG, CICHENG; LIU, NA; LI, GUANG. Responses of plant water use to a severe summer drought for two subtropical tree species in the central southern China. *Journal of Hydrology: Regional Studies*, v. 8, 2016, p. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2016.08.001>
- [40] CARMINATI, ANDREA; JAVAUX, MATHIEU. Soil Rather Than Xylem Vulnerability Controls Stomatal Response to Drought. *Trends in Plant Science, TRPLSC 1962*, 2020, p.1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.003>
- [41] RODRIGUEZ-DOMINGUEZ, CELIA M.; BRODRIBB, THIMOTY J. Declining root water transport drives stomatal closure in olive under moderate water stress. *New Phytologist*, v. 225, n. 1, 2020, p. 126-134. <https://doi.org/10.1111/nph.16177>
- [42] HAN, MIN; ZHANG, HUIHUI; DEJONGE, KENDALL C.; COMAS, LUIS H.; GLEASON, SEAN. Comparison of three crop water stress index models with sap flow measurements in maize. *Agricultural Water Management*, v. 203, 2018, p 366-375. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.02.030>
- [43] FENG, YU; CUI, NINGBO; DU, TAISHENG; GONG, DAOZHI; HU, XIAOTAO; ZHAO, LU. Response of sap flux and evapotranspiration to deficit irrigation of greenhouse pear-jujube trees in semi-arid northwest China. *Agricultural water management*, v. 194, 2017, p. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.08.019>
- [44] DE OLIVEIRA, PRISCILA; SILVA-PEREIRA, LIDIANE; COSTA-SILVA, DEMIRA; DE SOUZA-JÚNIOR, JOSÉ-OLIMPIO; GALVES-LAVIOLA, BRUNO; PINTO-GOMES, FABIO. Hydraulic conductivity in stem of young plants of *Jatropha curcas* L. cultivated under irrigated or water deficit conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 116, 2018, p. 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.066>
- [45] LI, SHAN; JANSEN, STEVEN. The root cambium ultrastructure during drought stress in *Corylus avellana*. *IAWA journal*, v. 38, n. 1, 2017, p. 67-80. <https://doi.org/10.1163/22941932-20170157>
- [46] HUGALDE, INES-PILAR; VILA, HERNAN-FELIX. Comportamiento isohídrico o anisohídrico en vides.... ¿Una controversia sin fin? [online]. 2014. Disponible:<http://ria.inta.gob.ar/sites/default/files/trabajo-senprensa/art.7hugalde-comportamiento.pdf> [citado 30 de Mayo de 2020].
- [47] DENG, XIMIN; JOLY, ROBERT; HAHN, DANIEL. The influence of plant water deficit on distribution of ¹⁴C-labelled assimilates in cacao seedlings. *Annals of botany* v. 66, 1990, p. 211-217. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088017>

- [48] SCOFFONI, CHRISTINE; ALBUQUERQUE, CAETANO; BRODERSEN, CRAIG R.; TOWNES, SHATARA V.; JOHN, GRACE P.; COCHARD, HERVÉ; BUCKLEY, THOMAS N.; SACK, LAWREN. Leaf vein xylem conduit diameter influences susceptibility to embolism and hydraulic decline. *New Phytologist*, v. 213, n. 3, 2017, p. 1076-1092.
<https://doi.org/10.1111/nph.14256>
- [49] WU, YUANZHI; ZHANG, YONGKUN; AN, JUAN; LIU, QIANJIN; LANG, YING. Sap flow of black locust in response to environmental factors in two soils developed from different parent materials in the lithoid mountainous area of North China. *Trees*, v. 32, n. 3, 2018, p. 675-688.
<https://doi.org/10.1007/s00468-018-1663-6>
- [50] ZHOU, H.; SUN, Y.; SHAN, G.; GRANTZ, D.A.; CHENG, Q.; LAMMERS, P.S.; CHEN, B. In situ measurement of stem water content and diurnal storage of an apricot tree with a high frequency inner fringing dielectric sensor. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 250, 2018, p. 35-46.
<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.12.002>
- [51] DAMM, A.; PAUL-LIMOGES, E.; HAGHIGHI, E.; SIMMER, C.; MORSDORF, F.; SCHNEIDER, F.D.; RASCHER, U. Remote sensing of plant-water relations: An overview and future perspectives. *Journal of plant physiology*, v. 227, 2018, p. 3-19.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.012>
- [52] DA SILVA-RIBEIRO, GABRIELLA; BBUD-RIGHI, CIRO. Canopy architecture of an agroforestry system: initial evaluation of a waveform system. *Agroforest Syst*, v. 94, 2020, p. 487-498.
<https://doi.org/10.1007/s10457-019-00415-2>