

Biotecnología Productiva y Sostenible

Antonia Gutiérrez Mora
Editora

Compiladores:

Sandra Sharry

Sergio Casas Flores

Marcela Amaro Rosales

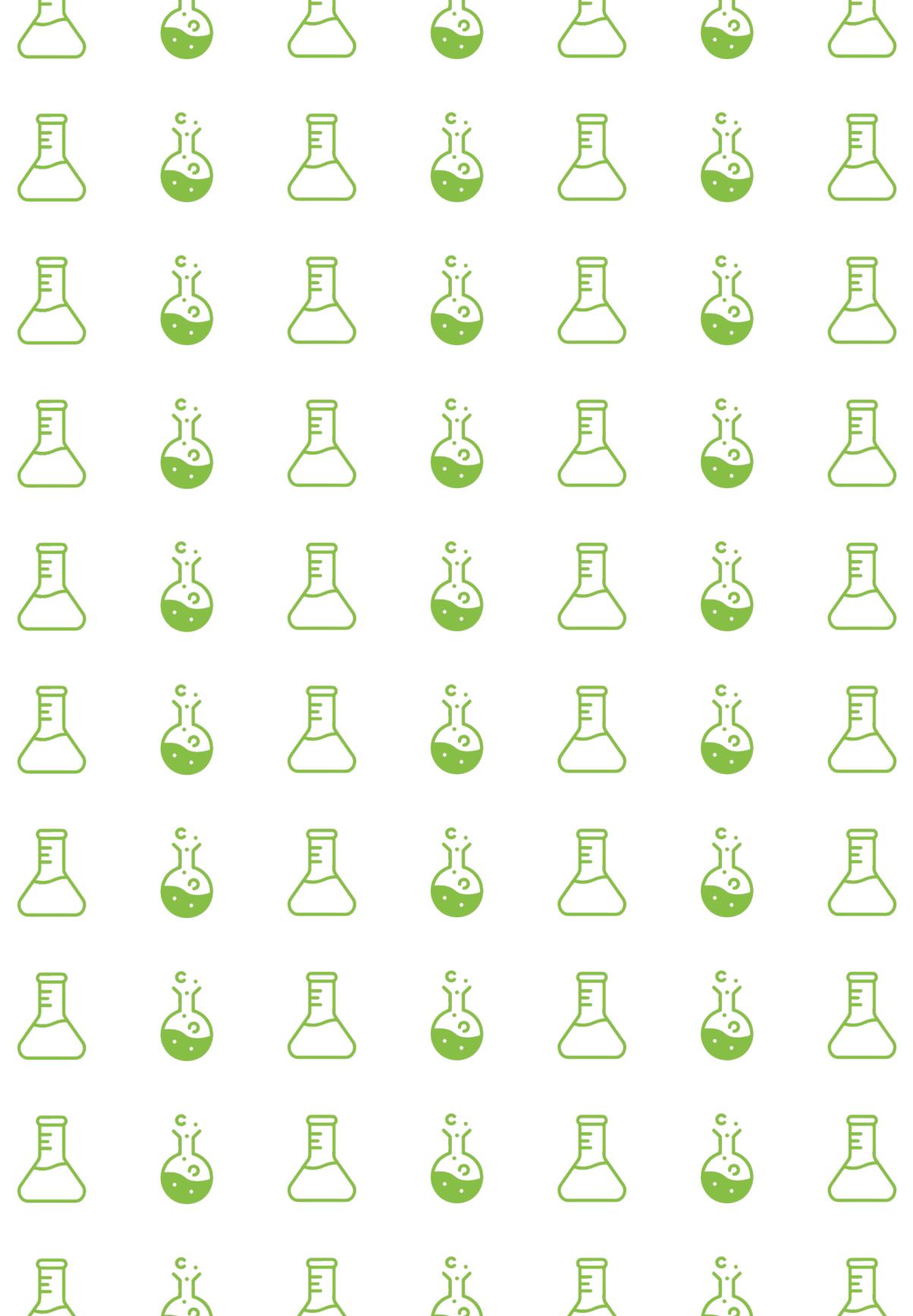
Jorge Alberto García Fajardo

Abel Gutiérrez Ortega



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL





Biotecnología Productiva y Sostenible

Biotecnología Productiva y Sostenible

Antonia Gutiérrez Mora
Editora

Sandra Sharry, Sergio Casas Flores, Marcela Amaro Rosales
Jorge Alberto García Fajardo y Abel Gutiérrez Ortega
Compiladores



Biotecnología Productiva y Sostenible

Primera edición: 2023

Diseño editorial: José Enrique Rentería Méndez

Diseño de portada: Nayeli Vallarta Díaz

© Por la edición y compilación: Antonia Gutiérrez Mora, Sandra Sharry, Sergio Casas Flores, Marcela Amaro Rosales, Jorge Alberto García Fajardo y Abel Gutiérrez Ortega

© Todos los textos son propiedad de sus autores

D. R. © Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y

Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, 44270 Guadalajara, Jal.

Evaluadores de capítulos

Sandra Sharry

Sergio Casas Flores

Marcela Amaro Rosales

Jorge Alberto García Fajardo

Abel Gutiérrez Ortega

María Cristina López Peralta

Mitzuko Dautt Castro

Saúl Jijón Moreno

Nicolás Gómez Hernández

Evaluadores de obra completa

Juan Izquierdo Fernández

Marco Dalla-Rizza

ISBN versión electrónica: 978-607-8734-57-3

Impreso y hecho en México

ÍNDICE

Prólogo.....	9
Biotecnología vegetal.....	13
Introducción.....	15
Biotecnología de <i>Capsicum</i> (chile): cultivo de tejidos, transcriptómica y algo más.....	17
Biotecnologías aplicadas a especies forestales nativas para restauración ecosistémica.....	41
Caracterización de resistencia a oídio en vides de vino: generación de nuevas variedades.....	57
Estudio de asociación del genoma completo para contenido de cianuro en clones de yuca.....	73
Thurincina h estimula la germinación y el crecimiento de raíz en plántulas de maíz bajo condiciones normales y de salinidad.....	87
Semillas sintéticas: una estrategia para la conservación de lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	101
Estudio descriptivo de tres variedades de <i>Musa</i> spp. cultivadas en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México.....	113
Morfología y acondicionamiento osmótico de semillas de chile perón (<i>Capsicum pubescens</i> R. y P.).....	125
Evaluación proximal de variedades de <i>Musa</i> spp. cultivadas en Ziracuaretiro, Michoacán, México.....	137
Diversidad genética y sus implicaciones en el mejoramiento genético de la quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).....	153
Cultivo de tejidos: una herramienta valiosa en la conservación, distribución e intercambio de germoplasma.....	169
Establecimiento de explantes de hojas de piña (<i>Ananas comosus</i> L. Merr) MD-2.....	177
Comparación de tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en la microtuberización de <i>Dioscorea alata</i>	187
Efecto de citocininas en el rendimiento de zarzamora (<i>Rubus</i> sp.) variedad Tupy.....	197
Biotecnología de microorganismos del suelo y planta.....	209
Introducción.....	211
Efecto de hongos formadores de micorriza arbuscular en la productividad y rentabilidad de la caña de azúcar para panela.....	213

Bacterias asociadas a meliponinos y su potencial enzimático y promotor de crecimiento.....	225
Control biológico de los hongos fitopatógenos <i>Alternaria</i> y <i>Fusarium</i> con <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en plantas de jitomate cherry.....	237
Captura de <i>Cydia pomonella</i> Mill. con trampas tipo delta y ala en árboles de membrillo.....	253
Identificación morfológica de parasitoides del género <i>Meteorus</i> sp. para el control biológico de plagas en maíz.....	265
Efecto de elicitores en respuesta a infección por <i>Fusarium</i> sp. en aguacate.....	277
Caracterización microbiológica de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de membrillo.....	291
Biotecnología pecuaria y acuícola.....	301
Introducción.....	303
Prevalencia y caracterización de bacterias metanogénicas de dos raciones para bovinos <i>in vitro</i>	305
Genes de resistencia a antibióticos en cinco especies de bacterias entéricas de origen porcino: un estudio bioinformático.....	319
Biotecnología y sostenibilidad de sistemas productivos.....	331
Introducción.....	333
Caracterización fisiológica de la respuesta a estrés por alta temperatura en <i>Carica papaya</i> cv maradol y silvestre.....	335
Biotecnología, modelos de negocios y aspectos socioeconómicos....	351
Introducción.....	353
La responsabilidad social de la biotecnología agrícola en el marco de la convergencia tecnológica.....	355
Cannabis.....	367
Introducción.....	369
Nanoemulsiones de aceite de CBD comercial elaboradas por homogenización a ultra alta presión.....	371
Soluciones y retos ante el COVID-19.....	387
Introducción.....	389
Evaluación de dos fuentes naturales de metabolitos como agentes antivirales contra SARS-COV-2.....	391

Prólogo

Según proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas (1996), la población mundial aumentaría en un 72% entre 1995 y el año 2050. De acuerdo a esta misma organización, se espera que para el 2050 se haya reducido el déficit alimentario, que haya un incremento en el consumo de alimentos per cápita en los países con escasez y se hayan diversificado los regímenes alimenticios de las poblaciones. Sin embargo, de acuerdo a esta misma organización, en 2021 se estimó que de 720 a 811 millones de personas pasaron hambre en 2020. Además, los costos excesivos y la dificultad para obtener alimentos impiden a miles de millones de personas lograr una alimentación saludable o nutritiva. Por si esto fuera poco, la manera como producimos alimentos en la actualidad causa pérdida de biodiversidad, degradación de los ecosistemas, estrés hídrico y contribuye de manera importante al calentamiento global.

Es claro que el desarrollo de la humanidad depende de nuestra capacidad de producir más y mejores alimentos, nuevos medicamentos, combustibles amigables con el medio ambiente y atención médica moderna. Como sociedad debemos resolver de manera concertada la urgente necesidad de restaurar y proteger el medio ambiente y conservar nuestra biodiversidad, haciendo uso racional y sostenible de este enorme tesoro. Estos desafíos incluyen el calentamiento global, la cantidad limitada de tierras cultivables y la probable aparición de nuevas plagas y enfermedades. En este escenario global, la biotecnología representa, sin duda, nuestra mejor opción para hacer frente a muchos de estos problemas y demandas.

El término biotecnología fue utilizado por primera vez en 1919 por Károly (Karl) Ereky, un brillante ingeniero húngaro, cuyas ideas y proyectos estaban directamente relacionados con la reforma agraria, un problema urgente en torno a la Primera Guerra Mundial. Ereky

tenía la firme convicción de que el logro de la reforma agraria, junto con la aplicación consciente de la biotecnología, beneficiaría el suministro de alimentos para la humanidad, mediante el uso razonable de los recursos naturales de nuestro planeta.

La biotecnología nos ha acompañado y contribuido al desarrollo de las civilizaciones desde que el hombre dejó de ser nómada. De hecho, algunos investigadores consideran que lo que hoy conocemos como biotecnología se remonta a la domesticación de animales y plantas comestibles hace ocho a diez mil años. Incluso los campos de la biotecnología médica y la biotecnología industrial son más antiguos de lo que comúnmente se piensa, ya que en China la cuajada de soja mohosa se utilizó como antibiótico durante más de 2 500 años y los crisantemos se utilizaron como insecticida hace 2 000 años. Curiosamente, con el paso del tiempo la biotecnología se ha convertido en un componente esencial de nuestras vidas. De hecho, parece que no está lejano el día en que no seremos capaces de entender nuestras vidas sin la biotecnología.

Desde finales del siglo XIX, los avances y descubrimientos en biotecnología han crecido a un ritmo exponencial. Sin embargo, la descripción de la estructura de doble hélice del ADN por James Watson y Francis Crick en 1953, y otra serie de avances clave en las décadas de 1960 y 1970 llevaron al desarrollo de lo que hoy conocemos como biotecnología moderna, que surgió alrededor de la década de 1980, con la ingeniería genética como su herramienta estratégica. Los avances recientes en la secuenciación del ADN y la ingeniería del genoma nos han adentrado en lo que llamamos la era genómica, proporcionando nuevas estrategias para producir nuevos compuestos de interés médico y diseñar sistemas agrícolas para proporcionar alimentos adecuados a la población del siglo XXI.

La biotecnología se usa hoy en día en el campo para combatir plagas, eliminando o reduciendo al máximo posible el uso de pesticidas químicos que degradan los ecosistemas y suponen un riesgo para la salud. La biotecnología también se usa para combatir la contaminación ambiental mediante la biorremediación y para producir alimentos y suplementos nutricionales de alta calidad, vacunas, sistemas de

diagnóstico y medicamentos avanzados. Así mismo, se utiliza para producir plásticos biodegradables, combustibles menos contaminantes y enzimas y proteínas necesarias para procesos industriales. Estas áreas de investigación fueron discutidas recientemente en la reunión XI RedBio México 2022.

Como se describe en el libro, la Biotecnología Agrícola incluye la producción de biofertilizantes y biopesticidas, como algunas especies de hongos, parasitoides y bacterias utilizadas como agentes de biocontrol (*Metharizium*, *Meteorus* y *Bacillus*), y microorganismos estimuladores del crecimiento vegetal como la bacteria *Bacillus subtilis*, hongos formadores de micorrizas y el hongo del suelo *Trichoderma atroviride*. En este campo, la biotecnología también ha contribuido con el cultivo de plantas *in vitro*, la clonación de variedades vegetales y la obtención de nuevas variedades de cultivos agrícolas que puedan resistir ataques de virus, patógenos, plagas e incluso se han obtenido plantas con mayor tolerancia a herbicidas, sequía, calor y heladas. También se han generado variedades de cultivos con mayor valor nutricional. En la actualidad, más de 13,3 millones de agricultores en el mundo utilizan la biotecnología agrícola para aumentar los rendimientos y reducir los daños causados por insectos y plagas, así como reducir el impacto en el medio ambiente.

La biotecnología médica ha hecho posible la obtención de vacunas y antibióticos, así como el desarrollo de nuevos fármacos o moléculas terapéuticas. Está ayudando a sanar el mundo aprovechando las herramientas que nos brinda la naturaleza y utilizando la información genética de las personas para reducir las tasas de enfermedades infecciosas. También contribuye a reducir las posibilidades de enfermedades graves y potencialmente mortales que afectan a millones de personas en el mundo: adaptando los tratamientos a las personas para minimizar los riesgos para la salud y los efectos secundarios, así como creando herramientas más precisas para la detección de enfermedades. Actualmente existen en el mercado más de 250 productos biotecnológicos para el cuidado de la salud y vacunas disponibles para los pacientes, muchos de ellos para enfermedades que antes no podían ser tratadas.

Prólogo

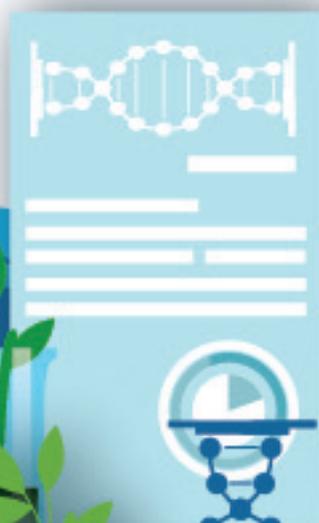
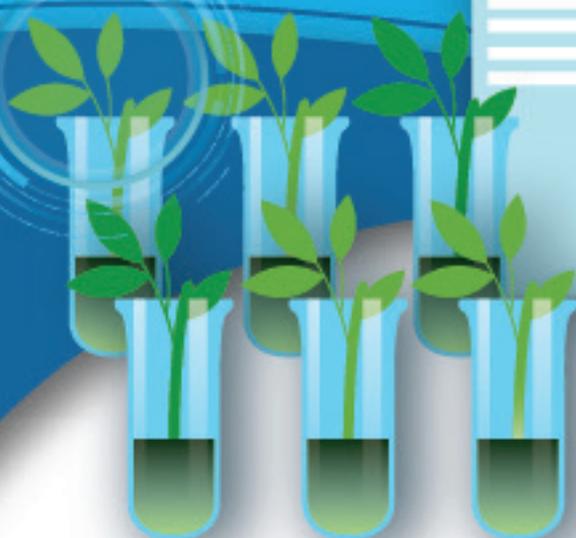
América Latina tiene la mayor diversidad biológica del planeta con más del 60% de la biodiversidad existente. Además, cuenta con muchas especies de animales, plantas y microorganismos que no se encuentran en ningún otro lugar del mundo. Esta enorme biodiversidad es una gran riqueza y una ventaja competitiva con mayor potencial que cualquier otro recurso. Si utilizamos esta biodiversidad de forma inteligente y respetuosa, la humanidad tendrá un futuro promisorio.

Hoy enfrentamos como región un desafío claramente establecido como la improrrogable necesidad de ser mucho más productivos con espacios limitados y en el menor tiempo posible, de lo contrario el rezago y las consecuentes deficiencias nos impedirán alcanzar las etapas de desarrollo y bienestar que América Latina tiene, exige y merece.

Este libro resume una serie de avances recientes en las áreas más relevantes de la biotecnología en América Latina y cuenta con la invaluable colaboración de expertos conocedores de temas agrícolas y de salud regionales que brindan evidencia de los avances regionales en Biotecnología. El libro abarca temas de Biotecnología Vegetal, Biotecnología de microorganismos vegetales y del suelo, Biotecnología ganadera y acuícola, Biotecnología y sostenibilidad de los sistemas de producción, Modelos de negocio y aspectos socioeconómicos, Cannabis y Soluciones y desafíos al COVID-19.

Dr. Alfredo Heriberto Herrera Estrella
Premio Nacional de Ciencias 2023
Medalla RedBio 2022

Biotecnología **Vegetal**



INTRODUCCIÓN

Esta sección presenta los avances en diferentes áreas y aplicaciones de la biotecnología vegetal. Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), la Biotecnología Vegetal es la aplicación de la ciencia y la tecnología en plantas, sus partes, productos y modelos para el desarrollo de conocimientos, bienes y servicios.

La biotecnología vegetal cuenta con un amplio abanico de aplicaciones como:

- Producción masiva de plantas (micro propagación);
- Mejora de variedades en función de caracteres de interés agronómico:
 - Productividad (resistencia a estrés biótico: plagas, virus, patógenos; tolerancia a estrés abiótico: sequía, salinidad..., tolerancia a herbicidas. Interacción planta-suelo, absorción, mejora metabolismo, etc).
 - Mejora nutritiva: enriquecimiento de vitaminas, mejor sabor, alimentos nutraceuticos.
 - Fisiología post-cosecha (retraso en maduración de frutos).
- Caracterización y propagación de plantas forestales, ornamentales, aromáticas, medicinales nativas;
- Fitorremediación;
- Biocombustibles;
- Bioinsumos;
- Bioprospeccion;
- Uso sostenible y conservación de la biodiversidad;
- Omicas aplicadas a plantas;
- Modificación genética, incluida la edición de genomas.

Introducción

La biotecnología vegetal presenta grandes avances en torno a los medios de producción y el desarrollo de productos, y durante REDBIO México 2022 hemos podido compartir gran parte de ellos.

Las contribuciones que los autores han realizado para esta sección incluyen estudios y avances en diferentes áreas y aplicaciones, como son la evaluación de la diversidad genética de cultivos de interés alimenticio, la micro propagación de especies forestales para la restauración ecosistémica, el escalamiento de la producción de propágulos de cultivos agronómicos, aportes de la genómica para la mejora vegetal y la producción de semillas sintéticas.

Esperamos que esta sección sea de interés para los lectores y que estos avances contribuyan al fortalecimiento de la biotecnología vegetal, principalmente en América Latina. Los invitamos a continuar leyendo.

Dra. Sandra E. Sharry
REDBIO Internacional

BIOTECNOLOGÍA DE *CAPSICUM* (CHILE): CULTIVO DE TEJIDOS, TRANSCRIPTÓMICA Y ALGO MÁS

Neftalí Ochoa-Alejo¹

RESUMEN

En los frutos de chile se sintetizan y se acumulan metabolitos secundarios como los capsaicinoides (compuestos picantes), pigmentos (antocianinas y carotenoides) y diferentes vitaminas, entre las que sobresale la vitamina C o ácido ascórbico, que poseen propiedades interesantes (benéficas para la salud) como antioxidantes, analgésicas, antitumorales, cardiovasculares, entre otras. El estudio bioquímico y molecular de la biosíntesis de esos diversos compuestos y su regulación se ha llevado a cabo directamente en los frutos de chile o en cultivos *in vitro* para entender los mecanismos involucrados en esos procesos y poder manipularlos por ingeniería metabólica. Para este propósito es necesario el desarrollo de protocolos *in vitro* para el cultivo de células, tejidos, órganos o la regeneración *de novo* de plantas, como etapa fundamental para la posterior manipulación de genes estructurales o reguladores de las diferentes rutas biosintéticas por ingeniería genética. Igualmente, es necesario el aislamiento, caracterización y los estudios de función de los genes estructurales y regulatorios, para lo cual los análisis transcriptómicos de los frutos de chile en diferentes estados de desarrollo y maduración pueden ser de enorme utilidad. La importancia del cultivo de tejidos vegetales, la transformación genética y la transcriptómica para el avance de la biotecnología de chile se presentan y se discuten en este capítulo.

PALABRAS CLAVE

Capsicum, chile, cultivo de tejidos, metabolitos secundarios, transcriptómica.

¹ Departamento de Ingeniería Genética, Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 libramiento norte carretera Irapuato-León, 36824-Irapuato, Gto., México. neftali.ochoa@cinvestav.mx

Introducción

El chile es un cultivo hortícola de importancia mundial. Todas las especies de chiles pertenecen al género *Capsicum* y son miembros de la familia Solanaceae. Se han descrito cerca de 42 especies (Barboza *et al.*, 2020), de las cuales solo cinco se han domesticado: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens*; de ellas, *C. annuum* es la especie más ampliamente cultivada en el mundo y México es considerado su centro de domesticación.

La producción nacional de chile fresco ascendió a cerca de 3 087 000 ton en una superficie de 149 694 ha cultivadas en el 2021, ocupando México el segundo lugar a nivel mundial, sólo después de China (Panorama Agroalimentario 2022). Los frutos de chile se consumen en forma directa como condimento, alimento o como productos industrializados y representan una fuente importante de vitamina C, provitamina A y también de vitamina E; además, producen metabolitos secundarios con actividad estimuladora del apetito, actividad inmunomoduladora, cardioprotectora, antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, antitumoral, anticancerígena, antiobesidad, antimicrobiana y antiséptica, entre otros (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2020; Batiha *et al.*, 2020; Azlan *et al.*, 2022; Chel-Guerrero *et al.*, 2022; Mandal *et al.*, 2023). Debido a esas características y propiedades, es conveniente su estudio desde un punto de vista básico, pero también investigaciones aplicadas a su mejoramiento. En ese sentido, se tomó como modelo biológico a las especies de *Capsicum* utilizando herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales y la transformación genética, así como estrategias que involucran técnicas de biología molecular y secuenciación masiva. Se hace énfasis en las rutas de biosíntesis de los compuestos que se sintetizan y se acumulan en los frutos de chile.

Compuestos sintetizados y acumulados en los frutos de chile

Los frutos de chile sintetizan y acumulan metabolitos secundarios únicos y exclusivos en la naturaleza como son los capsaicinoides, o compuestos picantes, y los carotenoides que le imprimen los colores

amarillo, anaranjado o rojo; este último debido a la acumulación de la capsantina y capsorrubina. Adicionalmente, biosintetizan diferentes tipos de vitaminas, entre las que destaca la vitamina C o ácido ascórbico. Algunos frutos de Chile también presentan pigmentación morada debida a la acumulación de antocianinas en el pericarpio, especialmente la delfinidina (Aza-González & Ochoa-Alejo, 2012b). Todos esos compuestos y algunos otros más (flavonoides y compuestos fenólicos, por ejemplo) presentan actividad antioxidante, lo que los hace adecuados e interesantes como productos nutraceuticos (benéficos para la salud) (Olatunji & Afolayan, 2019; Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2020; Mandal *et al.*, 2023; Razola-Díaz *et al.*, 2022). La bioquímica y biología molecular de la biosíntesis de los capsaicinoides, carotenoides, antocianinas y vitamina C en frutos de Chile la hemos reportado previamente (Aza-González *et al.*, 2011; Aza-González *et al.*, 2012a; Gómez-García & Ochoa-Alejo, 2013; Gómez-García & Ochoa-Alejo, 2016; Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2019; Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2023). Adicionalmente, hemos revisado la regulación transcripcional durante el proceso de maduración de frutos de Chile, incluyendo la regulación transcripcional de las vías biosintéticas de esos compuestos (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2021).

Los capsaicinoides son un grupo de análogos que hemos estudiado de manera más amplia utilizando el cultivo de tejidos vegetales y la transcriptómica; por ello, describiremos aquí, de manera general, la vía de biosíntesis de estos metabolitos secundarios. Los capsaicinoides más abundantes en los frutos de Chile son la capsaicina y la dihidrocapsaicina, y, en menor proporción, la nordihidrocapsaicina, la homodihidrocapsaicina y la homocapsaicina. Estos análogos se sintetizan exclusivamente en los tejidos de la placenta de los frutos de Chile a través de la confluencia de dos vías: la de los fenilpropanoides y la de los ácidos grasos ramificados (Aza-González *et al.*, 2011; Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2019) (Figura 1). La primera tiene como precursor inicial a la fenilalanina, que se convierte secuencialmente en ácido cinámico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, por medio de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL; por las siglas en inglés de la phenylalanine ammonia lyase), ácido ci-

námico 4-hidroxilasa (CA4H), ácido cumárico 3-hidroxilasa (CA3H), y el ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT), respectivamente. La enzima que convierte el ácido ferúlico (feruloil-CoA) en vainillina es la hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCHL), mientras que la enzima encargada de la biosíntesis de vainillilamina, a partir de la vainillina, parece ser una vainillina aminotransferasa (Weber *et al.*, 2014). La ruta de biosíntesis de los ácidos grasos ramificados inicia con los aminoácidos valina o la leucina. Cuando el precursor es la valina, se genera el α -cetoisovalerato gracias a la acción de la enzima transferasa de aminoácidos ramificados (BCAT); posteriormente se forma la isobutiril-CoA por una reacción catalizada por la catálisis de la deshidrogenasa/d Descarboxilasa del α -cetoácido de cadena ramificada (BCKDH), y luego el ácido 8-metil-6-nonenico, el ácido 8-metilpentanoico y la 8-metil-6-nonenil-CoA por la sintasa de ácidos grasos (FAS), la cetoacil-ACP sintasa (KAS), la acil-proteína acarreadora (ACL), la acil-ACP tioesterasa (FAT) y la acil-CoA sintetasa (ACS), sucesivamente. Finalmente, la capsaicinoide sintasa (CS) utiliza la vainillilamina y la 8-metil-6-nonenil-CoA para producir la capsaicina, el análogo más abundante de los capsaicinoides.

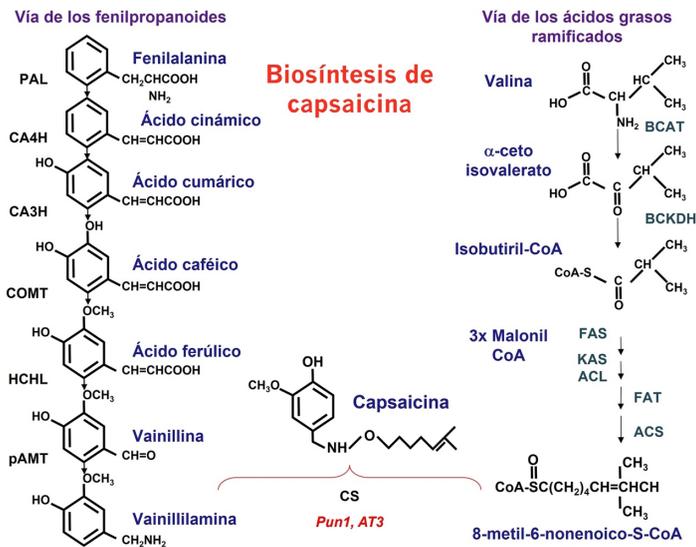


Figura 1. Ruta de biosíntesis de la capsaicina, principal capsaicinoide, en los frutos de chile (*Capsicum* spp.) a través de la conjunción de la vía de los fenilpropanoides y de la vía de los ácidos grasos de cadena corta ramificada. PAL, fenilalanina amonio liasa (por sus siglas en inglés); CA4H, ácido cinámico 4-hidroxilasa; CA3H, ácido cumárico 3-hidroxilasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; HCHL, hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa; pAMT, aminotransferasa putativa; CS, capsaicinoide sintasa; Pun1, locus del gen AT3 que codifica a la capsaicinoide sintasa (aciltransferasa); BCAT, transferasa de aminoácidos ramificados; BCKDH, deshidrogenasa/descarboxilasa del α-cetoácido de cadena ramificada; FAS, sintasa de ácidos grasos; KAS, cetoacil-ACP sintasa; ACL, acil-proteína acarreadora; FAT, acil-ACP tioesterasa; ACS, acil-CoA sintetasa

Cultivo de tejidos y transformación genética de chile

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) *in vitro* se refiere a un conjunto de técnicas que permite el cultivo de cualquier parte de una planta (sean células, tejidos u órganos) en un medio de cultivo artificial, en condiciones asépticas (libres de microorganismos) y en un ambiente

controlado. El cultivo de tejidos vegetales se desarrolló como una necesidad experimental para demostrar la teoría celular, que se refiere a que todos los seres vivos están constituidos por unidades básicas denominadas células, con metabolismo propio y capaces de dividirse y multiplicarse; igualmente, fue una herramienta fundamental para demostrar la totipotencia celular que implica que los organismos multicelulares están conformados por células que contienen la información genética necesaria para poder, bajo condiciones apropiadas, dividirse, diferenciarse y finalmente generar un organismo multicelular completo. Estas propiedades de las células vegetales han permitido la aplicación del CTV para los siguientes propósitos:

- 1) Multiplicación asexual, vegetativa, micropropagación o clonación de plantas.
- 2) Conservación y preservación de germoplasma.
- 3) Generación de variantes somaclonales.
- 4) Obtención de plantas libres de virus y enfermedades.
- 5) Producción de plantas haploides y dobles haploides (homocigotas o líneas puras).
- 6) Creación de híbridos somáticos.
- 7) Biosíntesis de metabolitos secundarios.
- 8) Transformación genética de plantas.
- 9) Estudios básicos genéticos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Algunas de esas aplicaciones del CTV se han experimentado en Chile como alternativa biotecnológica y para estudios básicos (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001). En la Figura 2 se muestran cultivos *in vitro* de Chile utilizados para estudios básicos. El CTV puede ser valioso para la recuperación de variantes somaclonales con características interesantes resultantes de modificaciones genéticas o epigenéticas durante la desdiferenciación y rediferenciación celular por el cultivo *in vitro*; por ejemplo, uno de los factores ambientales que más afecta la producción agrícola a nivel mundial es la sequía o el estrés hídrico. Por ello, es importante estudiar los mecanismos que les permiten a las

plantas hacerle frente a la deficiencia de agua. Con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia al déficit hídrico a nivel celular, y también para explorar la posibilidad de generar plantas de chile con mayor resistencia a la falta de agua, cultivos en suspensión de chile (Figura 2) fueron utilizados para la selección de líneas celulares tolerantes a la sequía, simulada por la presencia de 15% (p/v) de polietilenglicol (PEG 8000) en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 6.5 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.44 μM de benciladenina (BA) (Santos-Díaz & Ochoa-Alejo, 1994a). Clonas celulares se obtuvieron por plaqueo de suspensiones celulares en papel filtro sobre soporte de poliuretano bañado con el medio selectivo. De las colonias celulares individuales que crecieron en el medio selectivo se seleccionaron las clonas T6 y T7 y se cultivaron en medio líquido para generar suspensiones celulares. Las clonas celulares T6 y T7 se subcultivaron en concentraciones crecientes de PEG, consiguiendo crecimiento adecuado hasta en 20 y 25% de PEG, respectivamente. Las líneas celulares clonales resistentes mostraron una disminución del potencial osmótico de 3-3.5 veces en relación con las líneas control, lo cual denota que fueron capaces de ajustarse osmóticamente. Además, se determinó que el K^+ fue el soluto que mayormente contribuyó al ajuste osmótico, pues su contenido aumentó entre 1.3-3 veces comparado con el de las células no seleccionadas. Los niveles de otros solutos compatibles como la prolina y la glicinabetaína mostraron una correlación positiva con la resistencia al déficit hídrico. En otro estudio se realizó una comparación de resistencia al estrés hídrico a nivel celular, simulado por la presencia de PEG en el medio de cultivo, en suspensiones celulares de chile (*Capsicum annuum* L.) (mesofita; sensible al déficit hídrico) y cultivos celulares de gobernadora (*Larrea tridentata*) (xerofita; resistente al estrés hídrico) (Santos-Díaz & Ochoa-Alejo, 1994b). Las células en suspensión de *L. tridentata* mostraron una resistencia 6.6 veces mayor que las células de chile; además, se registraron valores de potencial hídrico más negativos en los cultivos celulares de *L. tridentata* que en los de chile, indicando una mayor capacidad de las células de gobernadora para crecer en condiciones de estrés hídrico, característica que presenta también a nivel de planta completa.

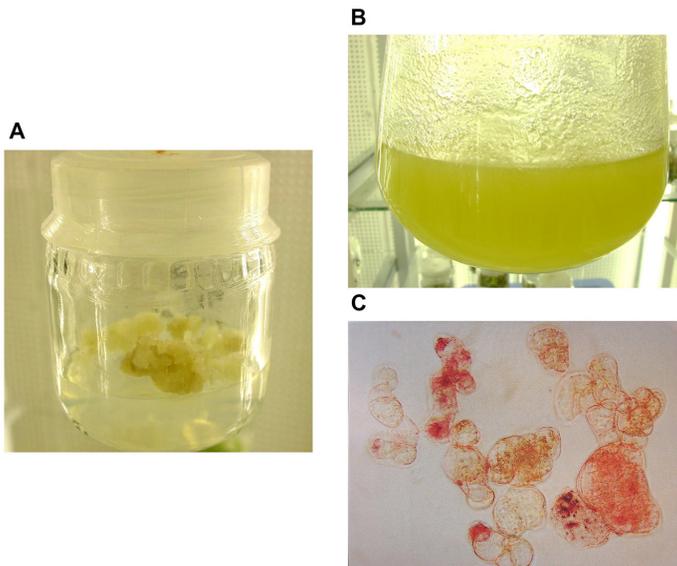


Figura 2. Tejido calloso (A) y cultivo en suspensión de chile (B), mostrando agregados celulares y células individuales (C)

Los cultivos de callos y suspensiones celulares de chile han sido modelos experimentales en nuestro laboratorio para estudiar su potencial para la producción de los capsaicinoides (Figura 2) (Salgado-Garciglia & Ochoa-Alejo, 1990; Ochoa-Alejo & Salgado-Garciglia, 1992; Ochoa-Alejo & Gómez-Peralta, 1993; Núñez-Paleniús & Ochoa-Alejo, 2005).

La funcionalidad de la ruta de biosíntesis de los compuestos picantes y algunas estrategias para aumentar los niveles de acumulación de los capsaicinoides se estudiaron en cultivos celulares de chile. Considerando que la fenilalanina es el precursor de los fenilpropanoides y de los capsaicinoides, y que la adición exógena de ese aminoácido incrementó los niveles de capsaicinoides en cultivos celulares de chile (Lindsay & Yeoman, 1984), nosotros hipotetizamos que si se generaran clonas celulares resistentes a la *p*-fluorofenilalanina, análogo de la fenilalanina no degradable, estas posiblemente producirían mayores niveles de fenilalanina de manera endógena y conducirían a una ma-

yor producción de capsaicinoides (Salgado-Garciglia & Ochoa-Alejo, 1990). Se seleccionaron cuatro clones celulares con diferente grado de resistencia al análogo por plaqueo de suspensiones celulares en medio semisólido conteniendo diferentes concentraciones de *p*-fluorofenilalanina. En general, las clones celulares resistentes a 500 μM del análogo acumularon mayores niveles de capsaicina, el capsaicoide más abundante en los frutos de Chile, en comparación con las células no seleccionadas (sólo 26.8%); sin embargo, el máximo valor de capsaicina en la clona celular resistente fue sólo el 24.9% del máximo registrado en los frutos de Chile (Salgado-Garciglia & Ochoa-Alejo, 1990). En un estudio subsecuente, y como parte de la caracterización de las clones celulares resistentes a la *p*-fluorofenilalanina, se determinó la actividad de la fenilalanina amonio liasa, fenilalanina, ácidos fenólicos y fenilpropanoides en las clones celulares seleccionadas, encontrando mayores niveles de actividad de la PAL y valores más altos de los precursores e intermedarios de la biosíntesis de los capsaicinoides en las clones resistentes, en comparación con las células control no seleccionadas (Ochoa-Alejo & Salgado Garciglia, 1992). Otra estrategia que se ha utilizado frecuentemente para intentar incrementar los niveles de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de plantas es la adición al medio de cultivo de precursores e intermedarios dentro de una ruta biosintética; en ese sentido, se investigó el efecto de la adición de fenilalanina y fenilpropanoides sobre la acumulación de capsaicinoides y lignina (polímero derivado de la vía de los fenilpropanoides) en las suspensiones celulares de Chile y se observó que en presencia de 100 μM de fenilalanina, ácido cinámico o ácido cafeico, no tuvieron influencia significativa sobre la acumulación de capsaicinoides; sin embargo, los mayores valores de capsaicinoides fueron registrados cuando se adicionó vainillina y, en orden decreciente, vainillilamina, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico (Núñez-Palenius & Ochoa-Alejo, 2005). Los contenidos de lignina en las suspensiones celulares no se afectaron significativamente en presencia de 100 μM de fenilalanina, ácido cinámico, ácido cafeico, ácido ferúlico, vainillina o vainillilamina, pero sí se incrementó de 10-15 veces cuando el medio fue suplementado con ácido *p*-cumárico.

Debido a los bajos niveles de capsaicinoides registrados en los cultivos en suspensión de chile, se utilizaron cultivos de callos (células no diferenciadas; Figura 2) para estudiar de manera comparativa la actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de esos compuestos midiendo comparativamente la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), ácido cinámico 4-hidroxilasa (CA4H), ácido cumárico 3-hidroxilasa (CA3H), ácido cafeico *O*-metiltransferasa (CAOMT) y capsaicinoide sintasa (CS) tanto en los callos a lo largo de su cultivo como en frutos de chile en diferentes etapas de desarrollo (Ochoa-Alejo & Gómez-Peralta, 1993). En general, el máximo de actividad específica de PAL, CA4H y CA3H en los callos fue similar a la de los frutos de chile, pero los valores de CAOMT y CS fueron 6 veces menores que la de los frutos, indicando una deficiencia notable en la actividad de esas dos enzimas, lo cual puede explicar la baja producción de capsaicinoides observada en los cultivos *in vitro*.

Los estudios anteriores mostraron que los cultivos *in vitro* de chile producen capsaicinoides en niveles muy inferiores a los registrados en los frutos, lo cual descarta su utilización para la producción industrial de esos compuestos. Es muy probable que eso se deba a que tanto las suspensiones celulares como los cultivos de callos están constituidos por células desdiferenciadas que no poseen la diferenciación, especialización y organización que sí tienen los tejidos de placenta de los frutos de chile en los que se sintetizan y se acumulan los capsaicinoides de manera específica. Por ello, una alternativa para la manipulación de la biosíntesis de capsaicinoides es la ingeniería metabólica por medio de la sobreexpresión o represión de genes estructurales o genes reguladores (factores de transcripción; FT) por ingeniería genética en plantas de chile, de tal manera que se sobreacumulen (por sobreexpresión génica) o se disminuya (por represión génica) su contenido de acuerdo con la demanda de los consumidores. Para este propósito es necesario contar con un protocolo eficiente de regeneración de plantas *in vitro* que pueda ser utilizado posteriormente para la manipulación de los genes biosintéticos y regulatorios de interés. En ese sentido, nuestras investigaciones sobre morfogénesis en los cultivos *in vitro* de chile nos llevaron a establecer sistemas de regeneración de plantas

(Ochoa-Alejo & García Bautista, 1990; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Valera-Montero & Ochoa-Alejo, 1992; Ramírez-Malagón & Ochoa-Alejo, 1996), así como condiciones para la transformación genética por medio de infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Ramírez Malagón, 1997).

Los estudios morfogenéticos en los cultivos *in vitro* de chile fueron los primeros realizados en nuestro grupo y consistieron en probar las respuestas de explantes de hipocótilo de chile ancho 'Esmeralda' (*C. annuum* L.) cultivados en el medio MS con combinaciones de la auxina ácido indolacético (AIA) y las citocininas benciladenina (BA), cinetina (Cin) o 2-isopenteniladenina (2iP) a concentraciones de 0, 5, 12.5, 25 y 50 μM , así como combinaciones de ácido nalftalenacético (ANA) o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y BA a las concentraciones antes mencionadas (Ochoa-Alejo y García-Bautista, 1990). Se observó la formación de brotes adventicios en los extremos cortados de los explantes de hipocótilo en los medios de cultivo conteniendo 5-50 μM de AIA y 25-50 μM de BA o 2iP; la rizogénesis se promovió en presencia de 1-50 μM de AIA o ANA (Figura 3). La generación de callos friables se presentó principalmente en los explantes cultivados en presencia de 2,4-D. En un estudio posterior, se investigó la capacidad de formación de brotes adventicios en 16 cultivares de chile cultivados en el medio MS suplementado con las dos combinaciones de reguladores de crecimiento que habían inducido brotes adventicios en el primer estudio: AIA/BA y AIA/2iP (Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990). El cultivar que mostró la mayor respuesta fue el Anaheim TMR-23, seguido, en orden decreciente, por los cultivares Ancho Esmeralda, Tampiqueño, Ancho 3015 y Serrano. Aunque se generaron brotes adventicios múltiples en esas variedades, el principal problema que se presentó fue con el proceso de elongación, pues se formaban solo estructuras foliares que no generaban brotes elongados.

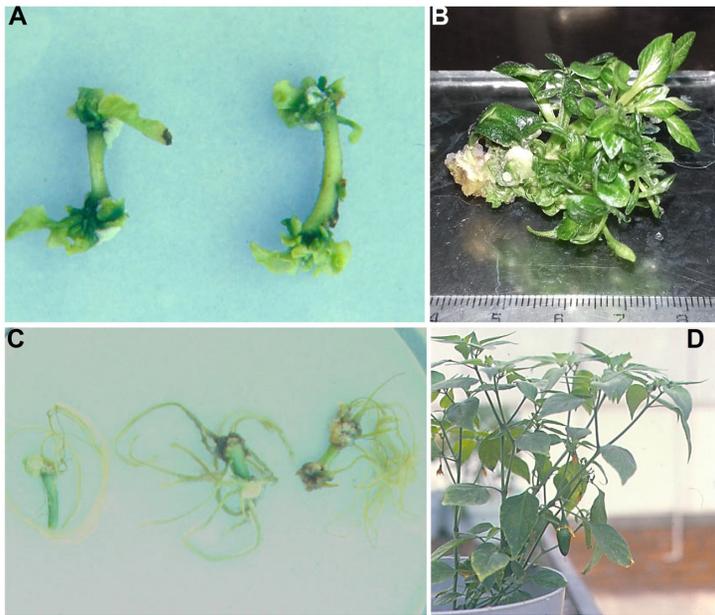


Figura 3. Regeneración de plantas de chile *in vitro*. Explantes de hipocotilo (A) y de cotiledón (B) mostrando la regeneración de brotes adventicios; explantes de hipocotilo con raíces adventicias en ambos extremos (C); la combinación de la regeneración de brotes adventicios y de la rizogénesis genera plantas completas (D)

Debido a esta situación, durante un buen tiempo se consideró al chile como recalcitrante para la regeneración de plantas *in vitro*. Para tratar de eliminar o minimizar ese problema, se idearon otros protocolos utilizando hipocótilos enraizados que se cultivaron de manera invertida en contacto con los medios inductores de brotes adventicios y luego colocados en posición normal en medio MS sin reguladores de crecimiento (Valera-Montero & Ochoa-Alejo, 1992). En un protocolo posterior se germinaron semillas de chile ‘Mulato Bajío’ en condiciones asépticas en el medio MS sin reguladores de crecimiento, luego las plántulas generadas fueron heridas por punción con una aguja abajo del par de cotiledones y posteriormente los ápices, incluyendo los cotiledones, fueron eliminados por decapitación;

la formación de brotes adventicios se observó en los sitios de punción, los cuales se elongaron de manera normal (Ramírez-Malagón & Ochoa-Alejo, 1996). Este protocolo de regeneración de brotes adventicios fue utilizado para la transformación genética por medio de infección por *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 4); para ello, las plántulas heridas por punción fueron infectadas *in situ* con una suspensión de la bacteria conteniendo un vector con el gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS). Los brotes regenerados en los sitios de las heridas se disectaron y fueron cultivados en medio inductor de raíces para la generación de las plantas completas (Ramírez Malagón, 1997). Las plantas regeneradas se sometieron a la prueba histoquímica de GUS para confirmar su carácter transgénico (Ramírez Malagón, 1997).

Transformación genética de chile y caracterización de las plantas transformadas

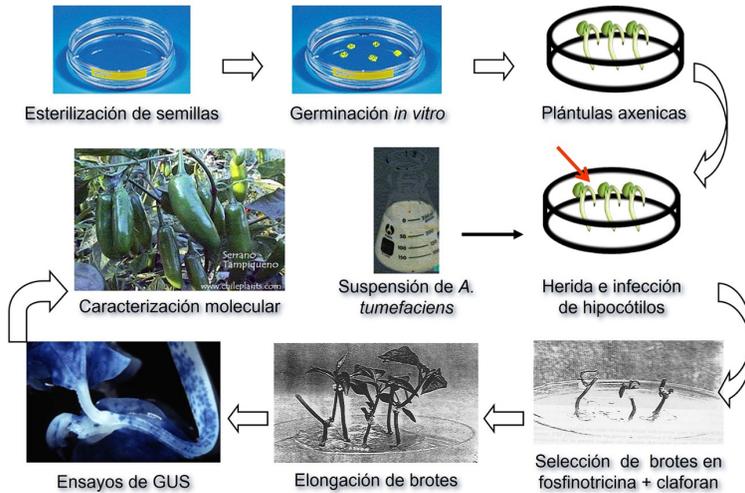


Figura 4. Protocolo de transformación genética de chile por infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Se muestran las diferentes etapas del protocolo. GUS, β -glucuronidasa

La capacidad de las células vegetales para regenerar plantas completas ha sido fundamental para que, a través de técnicas de biología molecular, sea posible hacer ingeniería genética para introducirles e integrarles en su genoma, de manera estable, genes específicos (transformación genética) que confieran alguna característica agronómica o industrial interesante como técnica moderna de mejoramiento genético y la generación de variedades de plantas más productivas o resistentes a enfermedades y plagas. Además, la manipulación de genes estructurales o reguladores de vías metabólicas ha hecho posible también la ingeniería metabólica para la modificación de procesos que conduzcan a la producción de metabolitos secundarios de plantas con actividades farmacológicas o industriales diversas e interesantes (Duradeva y DellaPenna, 2013; Baghalian *et al.*, 2014; Tatsis y O'Connor 2016; Selma *et al.*, 2023). Para poder llevar a cabo ingeniería metabólica en el caso de Chile, contamos con los sistemas de regeneración y transformación genética mediada por infección con *A. tumefaciens* (Figura 4), como ya describimos anteriormente, pero es necesario tener una fuente de genes estructurales y reguladores (FT) de las vías biosintéticas de interés. Para ello, es importante el estudio del transcriptoma de los frutos de Chile en diferentes etapas de desarrollo y maduración.

Transcriptómica de Chile

En el 2014 publicamos la dinámica del transcriptoma de frutos de Chile serrano ‘Tampiqueño 74’ durante el desarrollo y maduración utilizando las técnicas de secuenciación masiva (Martínez-López *et al.*, 2014). El transcriptoma es el conjunto de genes que se expresa en un determinado momento, sitio o bajo alguna condición específica. Como resultado de la secuenciación masiva (RNA-Seq) de genotecas durante el desarrollo y maduración de los frutos de Chile, se obtuvieron 15 550 468 lecturas que fueron ensambladas en 34 066 genes clasificados por su patrón de expresión y se agruparon por proceso biológico y por vía metabólica. Los resultados de la secuenciación se tienen en la base de datos pública denominada “Salsa”, que fue enriquecida más recientemente

con los datos de expresión de frutos en desarrollo y maduración de 12 accesiones (cuatro silvestres, seis domesticadas y dos cruza reciprocas entre una accesión silvestre y una domesticada) (Escoto-Sandoval *et al.*, 2021). A través de ella se puede obtener información acerca de genes estructurales de las rutas de biosíntesis de los diferentes compuestos que se sintetizan y se acumulan en los frutos, así como de genes de factores de transcripción que las regulan. Para ello se determina el patrón de expresión de un determinado gen estructural durante el desarrollo y maduración del fruto: luego se buscan genes de factores de transcripción que presenten un patrón de expresión igual o similar al del gen estructural, esto es, que coexpresen; esos genes de FT serán candidatos a participar en la regulación de ese gen estructural. La etapa siguiente para la ingeniería metabólica de una determinada vía biosintética es el estudio de función de los genes de los FT candidatos identificados.

Silenciamiento génico inducido por virus para el estudio de la función de genes de la biosíntesis de compuestos que se sintetizan y se acumulan en frutos de Chile

Para determinar la función de genes de plantas se recurre a estudios de pérdida o ganancia de función, o al silenciamiento o sobreexpresión con cada gen de FT candidato. En nuestro caso, hemos utilizado el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS; por sus siglas en inglés Virus-Induced Gene Silencing) para la demostración de la participación de los genes estructurales *COMT*, *pAMT* y *KAS* de la biosíntesis de los capsaicinoides (Abraham-Juárez *et al.*, 2008), del gen de la capsaicinoide sintasa o *AT3* (Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2015) y del gen del factor de transcripción denominado *CaMYB31* que regula esa ruta biosintética (Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2017). El silenciamiento inducido por virus de cada uno de esos genes causó una reducción significativa del contenido de capsaicinoides en los frutos de las plantas de Chile silenciadas en comparación con los de las plantas control. En el caso de genes de factores de transcripción, se espera que los niveles de sus transcritos en los frutos de plantas silenciadas de Chile sean significativamente menores a los de los frutos

control; además, se hipotetiza que al silenciar un gen de un factor de transcripción causará también una disminución en los transcritos de los genes estructurales que están bajo su control transcripcional y, consecuentemente, una reducción en el producto final de la ruta biosintética. Esto fue lo que se observó cuando se realizó el silenciamiento del gen del FT *CaMYB31* en los frutos de plantas de chile serrano ‘Tampiqueño 74’ utilizando como vector de silenciamiento una construcción en el TRV2 (*Tobacco rattle virus*: TRV2 por sus siglas en inglés) conteniendo una secuencia parcial del gen *CaMYB31* (Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo, 2017). Los frutos de plantas de chile silenciadas con el gen *CaMYB31* presentaron una reducción significativa de sus propios transcritos, de los genes estructurales de la ruta y de los niveles de capsaicinoides. Eso significa que el gen del factor de transcripción *CaMYB31* puede ser utilizado potencialmente para la ingeniería metabólica de la biosíntesis de los capsaicinoides de tal manera que se puedan incrementar o disminuir los niveles de los compuestos picantes para tener frutos de chile con mayor o con menor picor, de acuerdo con las preferencias del consumidor. Esta misma estrategia experimental fue aplicada para demostrar la participación de los genes de los factores de transcripción *MYB* y *WD40* en la regulación de la biosíntesis de antocianinas en frutos de chile *Capsicum eximium* que acumulan antocianinas de color morado (delfinidina) en las primeras etapas de desarrollo; en ese caso, el silenciamiento individual de cada uno de esos genes reguladores causó una pérdida parcial o total de ese pigmento, lo cual se hizo evidente a simple vista (Aguilar-Barragán & Ochoa-Alejo, 2014).

De manera reciente se abordó el estudio de la biosíntesis y regulación de los carotenoides en los frutos de chile a través del análisis de coexpresión de todos los genes estructurales de esa ruta biosintética (18) y el total de genes de factores de transcripción identificados en la base de datos ‘Salsa’ con las 12 accesiones mencionadas anteriormente (1 859) (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2022). De ese estudio se identificaron 83 potenciales genes de FT candidatos que mostraron una alta correlación de sus patrones de expresión con la de los genes estructurales blanco. Como criterio complementario para la selección

de los genes de FT candidatos, se realizó un análisis de la región promotora de los genes estructurales y se encontraron secuencias putativas de unión para 54 de ellos. Con cada uno de esos candidatos se realizará un estudio de función por silenciamiento génico inducido por virus para finalmente demostrar su papel regulador en la biosíntesis de los carotenoides. Aquellos genes de FT que resulten positivos en los estudios de función serán candidatos para la ingeniería metabólica de la biosíntesis de los carotenoides, de tal manera que puedan enriquecerse los frutos de chile para que tengan un mayor poder antioxidante, por ejemplo.

Conclusiones

El chile (*Capsicum* spp.) es un cultivo muy importante a nivel mundial y ha formado parte de la cultura en México desde tiempos precolombinos. Los frutos de chile han constituido la base alimenticia de los pueblos indígenas de América y son actualmente fuente importante de vitaminas, minerales y de una serie de metabolitos secundarios con una amplia variedad de efectos benéficos para la salud como son los compuestos picantes (capsaicinoides), pigmentos (carotenoides y antocianinas) y compuestos fenólicos. La biotecnología puede facilitar la manipulación genética de *Capsicum* para generar variedades mejoradas en menor tiempo, en comparación con los métodos convencionales de mejoramiento; para ello, es indispensable contar con protocolos de cultivos *in vitro* que permitan la regeneración de plantas combinados con sistemas de transformación genética eficientes. Adicionalmente, es necesario el conocimiento de procesos fisiológicos, bioquímicos, moleculares y genéticos que permitan la identificación y caracterización de genes específicos que confieran características de interés agronómico o industrial; en ese sentido, las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) son de un enorme valor. Los estudios del transcriptoma de frutos de chile en diferentes etapas de desarrollo y maduración han conducido a la generación de la base de datos “Salsa” que hemos utilizado como fuente de información de genes estructurales y de genes de factores de transcripción candidatos

a regular las diferentes vías de biosíntesis de los compuestos que se sintetizan y se acumulan en ellos. Aquí reportamos los avances que hemos tenido en el desarrollo de cultivos *in vitro* de chile y algunas de sus aplicaciones para la selección de líneas celulares tolerantes al estrés hídrico, así como para el estudio de la capacidad potencial de los cultivos de callos y suspensiones celulares para la biosíntesis de capsaicinoides. Adicionalmente, hemos descrito los avances en el establecimiento de sistemas de regeneración de plantas *in vitro* y transformación genética para la posible ingeniería metabólica de las vías biosintéticas de los compuestos característicos de los frutos de chile, con especial énfasis en los capsaicinoides, pero también en los carotenoides, antocianinas y vitamina C. La fuente de información de la base de datos “Salsa” nos ha permitido identificar potenciales genes reguladores (FT) de las diferentes vías biosintéticas en frutos de chile que, combinados con los estudios de función por silenciamiento génico inducido por virus, ya ha posibilitado la identificación de algunos genes de interés para los estudios futuros de ingeniería metabólica en chile.

Agradecimientos

Se agradece a la REDBIO por el apoyo para la participación en el encuentro.

Referencias

- Aguilar-Barragán, A., & Ochoa-Alejo, N. (2014). Virus-induced silencing of MYB and WD40 transcription factor genes affects the accumulation of anthocyanins in chilli pepper fruit. *Biologia plantarum*, 58(3), 567-574. doi: 10.1007/s10535-014-0427-4
- Arce-Rodríguez, M.L., & Ochoa-Alejo, N. (2015). Silencing AT3 gene reduces the expression of *pAmt*, *BCAT*, *Kas*, and *Acl* genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biologia plantarum*, 59(3), 477-484. doi: 10.1007/s10535-015-0525-y

- Arce-Rodríguez, M. L., & Ochoa-Alejo, N. (2017). An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Capsaicinoid Biosynthesis. *Plant physiology*, *174*(3), 1359–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00506>.
- Arce-Rodríguez, M. L., & Ochoa-Alejo, N. (2019). Biochemistry and molecular biology of capsaicinoid biosynthesis: recent advances and perspectives. *Plant cell reports*, *38*(9), 1017–1030. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02406-0>.
- Aza-González, C., Núñez-Paleniús, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant cell reports*, *30*(5), 695–706. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>.
- Aza-González, C., Núñez-Paleniús, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2012). Molecular Biology of Chili Pepper Anthocyanin Biosynthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *56*(1), 93-98.
- Aza-González, C., & Ochoa-Alejo, N. (2012). Characterization of Anthocyanins from Fruits of Two Mexican Chili Peppers (*Capsicum annum* L.). *Journal of the Mexican Chemical Society*, *56*(2), 149-151.
- Azlan, A., Sultana, S., Huei, C. S., & Razman, M. R. (2022). Antioxidant, Anti-Obesity, Nutritional and Other Beneficial Effects of Different Chili Pepper: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(3), 898. <https://doi.org/10.3390/molecules27030898>
- Baghalian, K., Hajirezaei, M. R., & Schreiber, F. (2014). Plant metabolic modeling: achieving new insight into metabolism and metabolic engineering. *The Plant cell*, *26*(10), 3847–3866. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130328>
- Barboza, G. E., García, C. C., Scaldaferrro, M., & Bohs, L. (2020). An amazing new *Capsicum* (Solanaceae) species from the Andean-Amazonian Piedmont. *PhytoKeys*, *167*, 13–29. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.167.57751>
- Batiha, G. E., Alqahtani, A., Ojo, O. A., Shaheen, H. M., Wasef, L., Elzeiny, M., Ismail, M., Shalaby, M., Murata, T., Zaragoza-Bastida, A., Rivero-Perez, N., Magdy Beshbishy, A., Kasozi, K. I., Jeandet, P., & Hetta, H. F. (2020). Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some *Capsicum* spp. and

- Capsaicinoids. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5179. <https://doi.org/10.3390/ijms21155179>
- Chel-Guerrero, L. D., Castañeda-Corral, G., López-Castillo, M., Scampicchio, M., Morozova, K., Oney-Montalvo, J. E., Ferrentino, G., Acevedo-Fernández, J. J., & Rodríguez-Buenfil, I. M. (2022). In Vivo Anti-Inflammatory Effect, Antioxidant Activity, and Polyphenolic Content of Extracts from *Capsicum chinense* By-Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4), 1323. <https://doi.org/10.3390/molecules27041323>
- del Rosario Abraham-Juárez, M., del Carmen Rocha-Granados, M., López, M. G., Rivera-Bustamante, R. F., & Ochoa-Alejo, N. (2008). Virus-induced silencing of Comt, pAmt and Kas genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta*, 227(3), 681–695. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0651-7>
- Dudareva, N., & DellaPenna, D. (2013). Plant metabolic engineering: future prospects and challenges. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 226–228. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.002>
- Escoto-Sandoval, C., Flores-Díaz, A., Reyes-Valdés, M. H., Ochoa-Alejo, N., & Martínez, O. (2021). A method to analyze time expression profiles demonstrated in a database of chili pepper fruit development. *Scientific reports*, 11(1), 13181. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92672-4>
- Gómez-García, M.del R., & Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International journal of molecular sciences*, 14(9), 19025–19053. <https://doi.org/10.3390/ijms140919025>
- Gómez-García, M. del R. & Ochoa-Alejo, N. (2016). Predominant role of the L-galactose pathway in L-ascorbic acid biosynthesis in fruits and leaves of the *Capsicum annuum* L. chili pepper. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1), 157-168. <http://dx.doi.org/10.1007/s2Fs40415-015-0232-0>
- Lindsey, K. & Yeoman, M. M. (1984). The synthetic potential of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*. *Planta*, 162, 495-501. <https://doi.org/10.1007/BF00399914>

- Mandal, S. K., Rath, S. K., Logesh, R., Mishra, S. K., Devkota, H. P., & Das, N. (2023). *Capsicum annuum* L. and its bioactive constituents: A critical review of a traditional culinary spice in terms of its modern pharmacological potentials with toxicological issues. *Phytotherapy research : PTR*, *37*(3), 965–1002. <https://doi.org/10.1002/ptr.7660>
- Martínez-López, L. A., Ochoa-Alejo, N., & Martínez, O. (2014). Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. *BMC genomics*, *15*, 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-143>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nuñez-Palenius, H. G. & Ochoa-Alejo, N. (2005). Effect of Phenylalanine and Phenylpropanoids on the Accumulation of Capsaicinoids and Lignin in Cell Cultures of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, *41*(6), 801–805. <http://www.jstor.org/stable/4293938>
- Neftalí Ochoa-Alejo, & Rafael Ramírez-Malagón. (2001). *In vitro* Chili Pepper Biotechnology. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, *37*(6), 701–729. <http://www.jstor.org/stable/4293539>
- Ochoa-Alejo, N., & Gómez-Peralta, J.E. (1993). Activity of Enzymes Involved in Capsaicin Biosynthesis in Callus Tissue and Fruits of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology*, *141*, 147-152.
- Ochoa-Alejo, N. & Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, *42*(1-2), 21-28. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90144-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90144-4)
- Ochoa-Alejo, N. & Ramírez-Malagón, R. (2001). *In vitro* Chili Pepper Biotechnology. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, *37*(6), 701–729. <http://www.jstor.org/stable/4293539>
- Ochoa-Alejo, N. & Salgado-Garciglia, R. (1992). Phenylalanine ammonia-lyase activity and capsaicin-precursor compounds in p-fluorophenylalanine-resistant and sensitive variant cells of chili pepper

- (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, 85(2), 173-179. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04720.x>
- Olatunji, T. L., & Afolayan, A. J. (2019). Comparative Quantitative Study on Phytochemical Contents and Antioxidant Activities of *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L. *The Scientific World Journal*, 2019, 4705140. <https://doi.org/10.1155/2019/4705140>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). *Panorama Agroalimentario 2022*. <https://drive.google.com/file/d/1jVWS4EFKK7HGwQOBp-GeljUyaDT8X8Iyz/view>
- Ramírez Malagón, R. (1997). *Estudios de regeneración de plantas in vitro y de transformación genética de chile (Capsicum annuum L.)* [Tesis de doctorado, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados].
- Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (1996). An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant cell reports*, 16(3-4), 226–231. <https://doi.org/10.1007/BF01890873>
- Razola-Díaz, M. D. C., Gómez-Caravaca, A. M., López de Andrés, J., Voltés-Martínez, A., Zamora, A., Pérez-Molina, G. M., Castro, D. J., Marchal, J. A., & Verardo, V. (2022). Evaluation of Phenolic Compounds and Pigments Content in Yellow Bell Pepper Wastes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(3), 557. <https://doi.org/10.3390/antiox11030557>
- Salgado-Garciglia, R., & Ochoa-Alejo, N. (1990). Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant cell reports*, 8(10), 617–620. <https://doi.org/10.1007/BF00270067>
- Santos-Díaz, M. S. & Ochoa-Alejo, N. (1994a). PEG-tolerant cell clones of chili pepper: Growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37(1), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00048110>
- Santos-Díaz, M. S. & Ochoa-Alejo, N. (1994b). Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chili pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte). *Plant Science*, 96(1-2), 21-29. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90218-6)

- Selma, S., Ntelkis, N., Nguyen, T. H., & Goossens, A. (2023). Engineering the plant metabolic system by exploiting metabolic regulation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 114(5), 1149–1163. <https://doi.org/10.1111/tpj.16157>
- Tatsis, E. C., & O'Connor, S. E. (2016). New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current opinion in biotechnology*, 42, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.04.012>
- Valera-Montero, L. L. & Ochoa-Alejo, N. (1992). A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Science*, 84(2), 215-219. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90137-B](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90137-B)
- Villa-Rivera, M. G., & Ochoa-Alejo, N. (2020). Chili Pepper Carotenoids: Nutraceutical Properties and Mechanisms of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5573. <https://doi.org/10.3390/molecules25235573>
- Villa-Rivera, M. G., & Ochoa-Alejo, N. (2021). Transcriptional Regulation of Ripening in Chili Pepper Fruits (*Capsicum* spp.). *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12151. <https://doi.org/10.3390/ijms222212151>
- Villa-Rivera, M. G. & Ochoa-Alejo, N. (2023). Ascorbic acid in chili pepper fruits: Biosynthesis, accumulation, and factors affecting its content. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 67(3), 187-199. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v67i3.2003>
- Villa-Rivera, M. G., Martínez, O., & Ochoa-Alejo, N. (2022). Putative Transcription Factor Genes Associated with Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Chili Pepper Fruits Revealed by RNA-Seq Coexpression Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11774. <https://doi.org/10.3390/ijms231911774>
- Weber, N., Ismail, A., Gorwa-Grauslund, M., & Carlquist, M. (2014). Biocatalytic potential of vanillin aminotransferase from *Capsicum chinense*. *BMC biotechnology*, 14, 25. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-25>

BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS A ESPECIES FORESTALES NATIVAS PARA RESTAURACIÓN ECOSISTÉMICA

Sandra Sharry^{1,2,3*}, Blanca Villarreal^{1,3}, Marina Adema^{1,5},
Sebastián Galarco¹, Diego Ramilo¹, Laura Pincioli^{1,5}, Mariano
Velázquez¹, Tatiana Cinquetti¹, Martín Ramos¹, Daniela Dalzotto^{2,4},
Christian Weber^{1,3}, Juan Manuel Cellini¹, Victoria Lien López^{1,4} y
Patricia Boeri²

RESUMEN

El proyecto de investigación multidisciplinar “Caracterización, propagación y viverización de especies vegetales (forestales, arbustivas y herbáceas) priorizadas para procesos de restauración ambiental” propone generar nuevo conocimiento sobre esta temática, como acciones concretas enmarcadas en la restauración ambiental de diferentes paisajes. En Argentina existe un cuello de botella por causa de la poca disponibilidad en cantidad y calidad de material vegetal de propagación de especies priorizadas para restauración. Son necesarios protocolos de propagación que permitan obtener un número de individuos en las cantidades que se requieren para procesos de restauración. La investigación en el campo de la biotecnología vegetal ha permitido desarrollar herramientas apropiadas para la conservación, caracterización y propagación de infinidad de especies vegetales. La micropropagación y el almacenamiento *in vitro*, son algunas de las biotécnicas más sencillas que pueden utilizarse para apoyar programas de propagación de plantas, junto con la macropropogación y los ensayos de semillas. En este trabajo presentamos se presentan algunos resultados del proyecto, específicamente la optimización de

¹ Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. La Plata, Argentina. * correo: ssharry@agro.unlp.edu.ar

² Universidad Nacional de Río Negro. Sede Atlántica. CIT Río Negro.

³ Comisión de Investigaciones Científicas de Buenos Aires. CICPBA

⁴ CCT La Plata - CONICET

⁵ Ministerio de Ambiente de la Provincia de Buenos Aires.

protocolos de germinación de *Polylepis tarapacana* y la micropropagación de *Neltuma caldenia* y *N. alpataco*, *Geoffroea decorticans*, *Erythrina crista-galli*, *Parkinsonia aculeata* y *Vacchellia caven*.

PALABRAS CLAVE

Neltuma, *Polylepis tarapacana*, *Vacchellia*, *Parkinsonia*, *Erythrina*.

Introducción

Los ecosistemas forestales de Argentina se han visto afectados por una drástica disminución de sus recursos por la sobreexplotación, lo que ha acentuado su progresiva degradación y deterioro. El Plan nacional de restauración de bosques nativos de Argentina (Res 267/2019), enmarcado en la década de la restauración, requiere plantines forestales nativos para ser establecidos a campo. Para poder cumplir con este desafío en plazos relativamente cortos, es necesario incorporar soluciones tecnológicas que permitan la producción masiva de materiales de propagación de calidad y sanidad controlada. El proyecto de investigación multidisciplinar denominado “Caracterización, propagación y viverización de especies vegetales (forestales, arbustivas y herbáceas) priorizadas para procesos de restauración ambiental” propone generar conocimientos sobre esta temática, así como acciones concretas enmarcadas en la restauración ambiental de diferentes paisajes. Son pocas las experiencias exitosas y bien documentadas de propagación masiva de especies nativas que cuenten con la integralidad de criterios ecológicos, genéticos, silviculturales y sociales para este objetivo. Las especies exóticas han recorrido un proceso de estudio, conocimiento y domesticación más amplio y continuo que podría ser adaptado en parte para especies nativas con potencial uso en restauración (Villota *et al.*, 2020). En los últimos años, la investigación en el campo de la biotecnología vegetal ha permitido desarrollar técnicas o herramientas apropiadas para la conservación, caracterización, y propagación de infinidad de especies vegetales. La micropropagación, y el almacenamiento *in vitro*, son algunas de las biotécnicas más sencillas que pueden utilizarse para apoyar programas de propagación de plantas,

junto con la macropropagación y los ensayos de semillas (Sharry et al, 2015). En este trabajo presentamos algunos resultados del mencionado proyecto, específicamente la optimización de protocolos de germinación de *Polylepis tarapacana*, especie arbórea endémica de Argentina, y la micropropagación de leñosas nativas (*Neltuma*, *Erythrina*, *Parkinsonia* y *Vachellia*). También se iniciaron ensayos para producir unidades encapsulables de *Neltuma*. Materiales y métodos

La producción de plántulas para cada especie involucra requerimientos específicos que deben ser ajustados para lograr su protocolo de propagación. En el caso de *P. tarapacana*, se realizaron ensayos de germinación. Para las demás especies (*Neltuma*, *Erythrina*, *Parkinsonia* y *Vachellia*) se aplicaron las metodologías de micropropagación. Las tareas abarcan la selección y georreferenciación a campo de las plantas madres, la obtención de explantes en jardines clonales y su acondicionamiento y desinfección, la introducción *in vitro* de diferentes explantes, la inducción de morfogénesis, el enraizamiento de brotes y la aclimatación de los mismos. El proceso termina con la rusticación y recría en viveros hasta su reintroducción en el ecosistema.

Germinación de frutos de *Polylepis tarapacana*

Se calculó la producción de frutos mediante el método de relación del diámetro (Chapman *et al.*, 1992) contando el número de frutos en dos ramas de un individuo y extrapolando al resto de las ramas del árbol en 93 árboles provenientes de 14 sitios de muestreo (22°04'–23°40'S a 66°46'–65°49'W) en la Provincia de Jujuy, con una elevación entre 4375 y 4751 msnm. Asimismo, en otro muestreo se realizó una colecta de semillas a campo, en dos ubicaciones (Cerro Ramadas 22°11'S-66°37'W, Cerro Granada 22°33'S-66°31'W), recolectando frutos en 31 parcelas según cuatro gradientes de elevación, baja (<4400 m), dos valores intermedios (4400-4600 y 4600-4800 m) y alta (>4800 m). Se caracterizó la estructura forestal en diámetro en la base (DAB - cm) de cada individuo, la altura (H - cm), la cobertura de cada individuo (CC - cm²), y se asignó una forma de vida: arborescente (Ar), árboles enanos (Dt), arbustos (Sh) o brousse tigrée (Bt) a cada

individuo según López *et al.* (2023). Se clasificaron todos los frutos en intervalos de 1 mg. Se realizaron experimentos de germinación para evaluar los efectos principales y combinados del origen de elevación y la sequía en el rendimiento de la germinación, utilizando un diseño experimental factorial. Para el ensayo de germinación se utilizaron cajas Petri de vidrio y papel filtro estéril con 10 ml de líquido. Para simular el estrés por sequía, utilizamos una solución de Manitol ($\Psi = -0.8\text{MPa}$ según Zhang *et al.* (2017) y se compararon con un control ($\Psi = 0\text{MPa}$) preparado con agua destilada (Michel & Kaufmann 1973; Villela *et al.* 1991). Se armaron 706 placas Petri, y se colocaron en gabinetes de pruebas climáticas, modelo 2301 (RUMED, Laatzten, Alemania) con un rango de temperatura de 20°C de día (12 horas), 10°C de noche (12 horas) (Seltmann *et al.*, 2007; Marcora *et al.*, 2008) con condiciones de luz blanca fría (400–700nm). Se registró el número de frutos germinados cada 2 o 3 días, relevando fecha y el número de observaciones de frutos con protrusión de la radícula (ISTA, 2006). Se calculó el porcentaje de germinación como el número de frutos germinados, con respecto al total. Se ajustó una regresión no lineal entre la producción de frutos por ha. (PFPT) y el DAB, la H y CC discriminando por la forma de vida según López *et al.*, (2023). Se estimó la producción de frutos por ha y se realizó un ANOVA de una vía entre el porcentaje de germinación total y, como respuestas, la elevación y tratamiento osmótico (0 -0.8 MPa). Cuando el ANOVA indicó una diferencia, realizamos pruebas *post-hoc* de Tuckey ($p < 0.05$). Las pruebas de normalidad se realizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento, se aplicó Kruskal-Wallis y las diferencias con la prueba de Conover-Iman a $p < 0.05$.

Micropropagación de *Neltuma sp* y *Geoffroea decorticans*

Los explantes del género *Neltuma* se obtuvieron de semillas germinadas *in vitro*, con un proceso de escarificación mecánica para romper la dormancia. En el caso de *G. decorticans*, el material de partida fue seleccionado de plantas cultivadas en condiciones de invernadero. Las semillas de *Neltuma spp.* fueron desinfectadas con una inmersión

en etanol (70% v/v) entre 1 y 5 minutos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) (20-30% v/v) durante 20-30 minutos. Luego las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Los explantes de *G. decorticans* extraídos de plantas de invernadero fueron desinfectados mediante una inmersión en una solución al 10% de NaClO durante 10 minutos, seguida de enjuagues repetidos con agua destilada estéril. Las semillas de *N. alpataco*, *N. flexuosa* y *N. caldenia* fueron colocadas para germinar en medio de cultivo MS (Murashig- Skoog, 1962) a la mitad de la concentración, mientras que los explantes desinfectados de *G. decorticans* fueron cultivados en Woody Plant Medium (WPM-Lloyd and McCown, 1981) a la mitad de la concentración. Ambos medios de cultivo fueron suplementados con sacarosa (3 g.L⁻¹) y agar (7 g/L). Al cabo de 3 semanas, las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de *N. caldenia* y *N. flexuosase* se cortaron aproximadamente a 1 cm del nudo cotiledonar (desde el hipocotilohipocótilo y conservando los cotiledones), y luego se les quitó el ápice. Para *G. decorticans* se utilizaron como explantes segmentos uninodales. Como regulador de crecimiento se utilizó la citoquinina BAP (6-Bencilaminopurina) para inducir la formación de brotes múltiples a concentraciones de: 4,4 – 6,7 y 8,8 µM, para *N. caldenia* (tres repeticiones de 15 explantes, N=45), 22 µM para *N. flexuosa* (tres repeticiones de ocho explantes, N=24) y 5 mg/L para *G. decorticans* (tres repeticiones de 15 explantes, N=45). Para ambos casos se mantuvieron explantes testigo cultivados en medios libres de reguladores de crecimiento. Luego de 1 mes para los explantes de *Neltuma spp.* y 5 meses para los de *G. decorticans*, se registró el porcentaje final de explantes con brote y callo y el número de brotes por explante.

Para elaborar unidades encapsulables (UE) de *N. alpataco* se utilizó una matriz de alginato de sodio al 2% estéril, en la cual se sumergieron yemas axilares de plantas germinadas *in vitro* de tres meses de crecimiento; estas yemas axilares fueron recogidas con una pipeta en una gota de alginato de sodio y rápidamente sumergidas en una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) 100 mM estéril durante 5 minutos. Luego, las UE fueron extraídas de la solución de CaCl₂ y dispuestas en una placa de Petri con medio MS a la mitad de la concentración

para evaluar su porcentaje de conversión (crecimiento de la yema y emergencia de la cápsula de alginato).

Microestaquillado de *Erythrina crista-galli* (seibo), *Vachellia caven* (espinillo) y *Parkinsonia aculeata* (cina-cina)

El material de partida fueron microestacas obtenidas de vitroplantas. Las semillas se acondicionaron, desinfectaron y sembraron en 2 medios de cultivo como se muestra en el Cuadro 1. El medio de aislamiento consiste en una mezcla de agua, azúcar (20gr/L) y agar (6 gr/L) y el Medio MS/2 está formulado sólo con los macro y micronutrientes de Murashige-Skoog a la mitad de su concentración, ambos sin reguladores de crecimiento. El pH de los medios de cultivo se midió con potenciómetro electrónico y se ajustó a 5.8 - 6,2 con hidróxido de sodio 1N y ácido cítrico. Los mismos se esterilizaron en autoclave a 120°C, durante 20 minutos y a 1 atmósfera de presión. Las secciones nodales provenientes de las vitroplantas (30 días de cultivadas) se colocaron en medio MS/2 adicionado con BAP (1mg/L) + Ácido Naftalenacético-NAA (0,5 mg/L) para inducir la formación de brotes. El medio WPM/2 con 30 g/L de sacarosa y 7,5 g/L de agar, adicionado con NAA (0,1 mg/L) se usó para inducir enraizamiento. Para la aclimatación de las plantas se utilizaron envases de plástico con sustrato estéril mezcla de tierra-perlita (3: 2) y se las cubrió con bolsas de nylon. Los cultivos fueron mantenidos en cámaras climatizadas, la fuente de luz proviene de lámparas LED con 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad. La temperatura se reguló en 21°C +/- 2°C.

CUADRO 1. Acondicionamiento y germinación de semillas de seibo, espinillo y cina-cina

Especie	Acondicionamiento y Desinfección	Medios de cultivo	Tiempo aprox. de exposición al medio de cultivo
<i>Erythrina crista-galli</i> (seibo)	Hipoclorito de sodio comercial al 50% durante 1 h de inmersión. Peróxido de hidrógeno (5 v/v) durante 1 hora. Enjuagues con agua estéril (3).	- Aislamiento - MS /2	10 - 20 días 1 o 2 meses
<i>Vacbellia caven</i> (Espinillo)	Ácido sulfúrico 98%, durante 2 h. Lavado con agua corriente (10 min). Desinfección: etanol 70% (5 minutos) e hipoclorito de sodio 20% (30 minutos). Enjuagues con agua estéril (3).	- Aislamiento - MS /2	10 - 20 días 1 mes a 70 días (aprox.)
<i>Parkinsonia aculeata</i> (cina- cina)	Hipoclorito de sodio comercial al 50% durante 1 h de inmersión. Peróxido de hidrógeno (5 v/v), durante 1 hora. Enjuagues con agua estéril (3).	- Aislamiento - MS /2	10 - 20 días 1 mes a 70 días (aprox.)

Resultados

Polylepis tarapacana

Producción de frutos

Los individuos de *P. tarapacana* presentaron un marcado gradiente de CC, DAB, H y PFPT (Tabla 1). La PFPT promedio fue de 811 por árbol, variando entre 0 y 5232.

Tabla 1. Rangos de las variables medidas y producción de frutos en diferentes formas de vida de *P. tarapacana* en el norte argentino

Forma		CC	DAB	HT	PFPT
Ar	Min	425.0	1.0	22.5	0
	Prom	5971.5	11.0	107.6	949
	Máx	21572.0	26.0	256.0	5232
Dt	Min	298.7	4.0	46.0	2
	Prom	4734.2	12.6	134.0	1596
	Máx	10917.1	20.5	206.0	4728

Sh	Min	1311.7	2.2	31.0	1
	Prom	11775.1	7.8	101.7	783
	Máx	47614.9	26.0	247.0	5136
Bt	Min	3639.9	1.1	31.0	2
	Prom	10301.4	4.5	60.4	150
	Máx	16517.7	12.0	84.5	738
Total	Min	298.7	1.0	22.5	0
	Prom	9017.2	8.7	99.8	811
	Máx	47614.9	26.0	256.0	5232

PFPT: Producción de frutos de *P. tarapacana* en n por individuo, H: Altura total en cm, CC: Cobertura en cm², DAB: Diámetro en cm en la base, arborescente (Ar), árboles enanos (Dt), arbustos (Sh) o brousse tigrée (Bt) según López *et al.*, (2023), Mín: mínimo, Prom: promedio, Máx: máximo.

El modelo para predicción de PFPT para diferentes formas de vida presentó un buen ajuste en MSE_{Error}, Sigma y AIC: **PFPT=(-DAB*CC)^a** donde: “a” es el parámetro de la ecuación, que toma diferentes valores para cada forma de vida (Ar=0.6134, Dt=0.6741, Sh=0.5875 y Bt=0.4772). El modelo presentó una tendencia significativa positiva y se observó que la cantidad de frutos que producen fue diferente para las diferentes formas de vida. La producción de frutos por hectárea no presentó diferencias significativas dadas por la elevación en msnm, por la ubicación geográfica ni por la pendiente, siendo el promedio de 1075044.8 ± 751667.1 Frutos.ha⁻¹. El peso promedio por fruto fue de 0,0055 g y varió entre 0,0025 y 0,0174 g. En relación a el peso de frutos, vemos que la frecuencia de los pesos presentó un marcado desplazamiento hacia los mayores pesos dado por la elevación (Figura 1), donde los frutos más livianos corresponden a las elevaciones más bajas.

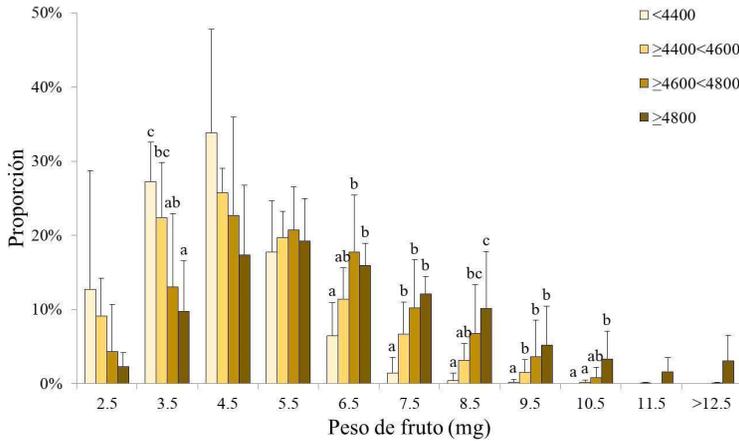


Figura 1. Histograma de frecuencia en porcentaje del peso de semillas de *P. tarapacana* en un gradiente de elevación en el Altiplano Jujeño, Argentina. Elevación en msnm. Las diferencias se determinaron mediante comparaciones de medias con la prueba de Conover-Iman a $p < 0,05$.

Germinación de *P. tarapacana*

Los promedios de germinación presentaron diferencias dadas por la elevación y el peso de las semillas (Tabla 2), con un promedio de 18.3%. A elevaciones bajas, el poder germinativo es significativamente mayor, siendo más del doble que en elevaciones superiores. De acuerdo con Renison y Cingolani (1998), la presencia de frutos no viables ocurre con mayor frecuencia en lugares donde las poblaciones de *Polylepis* son reducidas o con individuos aislados, situación habitual en las poblaciones de *P. tarapacana* en las mayores elevaciones (>4600 msnm) (López *et al.*, 2022).

Tabla 2. ANOVA del porcentaje de germinación discriminados por elevación y peso de frutos para los tratamientos con (sequía) y sin manitol ($\Psi = -0.8$)

Variable	Factor	n	$\Psi=0$	$\Psi=-0.8$
Elevación (msnm)	<4400	19	28.6 \pm 3.8 b	15.6 \pm 3.5 b
	$\geq 4400 < 4600$	36	26.4 \pm 2.7 b	17.4 \pm 2.5 b

	≥4600<4800	26	11.4±3.2 a	2.9±2.9 a
	≥4800	23	9.9±3.4 a	2.7±3.1 a
	F		8.71	7.48
	p		<0.0001	0.0001
Peso de frutos (mg)	<4	26	0.5±3.2 a	0.7±3.0 a
	≥4<6	28	8.5±3.1 a	4.1±2.8 ab
	≥6<8	28	22.7±3.1 b	11.7±2.8 b
	≥8	22	44.2±3.6 c	23.6±3.3 c
	F		31.25	11.50
	p		<0.0001	<0.0001

Las diferencias se determinaron mediante comparaciones de medias con la prueba de Conover-Iman a $p < 0,05$.

Con el tratamiento con Manitol la germinación de *P. tarapacana* disminuye a menos de la mitad. La germinación de frutos se encuentra influenciada por la disponibilidad de agua y el peso estos. Frutos con un peso inferior a 4 mg presentaron un poder germinativo inferior al 1%, tanto para el tratamiento con agua como para el de Manitol. A medida que el peso aumenta, el poder germinativo es mayor, alcanzando valores de 44.2% en frutos de más de 8 mg. Se demostró que el aumento de la masa de frutos dentro de las especies se correlaciona con un aumento en la germinación de semillas (Cordazzo, 2002; Hitchmough & Vera, 2002). Las semillas más grandes pueden tener un mayor éxito de establecimiento, ya que proporcionan más reservas para las plántulas (Moles & Westoby, 2004), por otro lado, las semillas más ligeras podrían tener una mayor distancia de dispersión, teniendo en cuenta que la dispersión en *P. tarapacana* se da por el viento (Moles & Westoby, 2004; Seiwa & Kikuzawa, 2011).

Micropropagación de especies forestales nativas

Se han ajustado los protocolos de micropropagación por estaquillado de *Erythrina crista-galli* (seibo), *Vachellia caven* (espinillo), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina), y por organogénesis de *Neltuma caldenia* y *Geoffroea decorticans* (chañar).

La adición de citoquininas al medio de cultivo tuvo influencia en la producción de brotes de *Neltuma* spp y *G. decorticans*. En el caso de *N. flexuosa*, se obtuvieron alrededor de 4 brotes por explante (Figura 2 A), mientras que en la ausencia de reguladores de crecimiento se observó 1 brote. Los explantes cotiledonares de *N. caldenia* en presencia de BAP desarrollaron $6 \pm 0,4$ brotes por explante, sin embargo, la mayoría no superaron los 0,5 cm de longitud (Figura 2 B). Por otro lado, el mayor porcentaje de brotes elongados se observó en la concentración de $4,4 \mu\text{M}$ (33%), aunque el mayor número de brotes por explante se obtuvo en el medio de cultivo adicionado con $6,7 \mu\text{M}$ de BAP ($2,3 \pm 0,5$ brotes). El 40% de los explantes de *N. caldenia*, tanto en el control como en los tratamientos, forman brotes. Se observó un alto porcentaje de callos en los explantes de ambas especies del género *Neltuma* (entre 40 y 100%), tanto con BAP como en los controles. En el caso particular de *N. caldenia*, luego de 1 mes transcurrido el ensayo, los callos cubren la totalidad del explanto y los nuevos brotes. En el caso de *G. decorticans*, el porcentaje de explantes con brotes múltiples fue del 11%. Aquellos brotes que elongaron en el medio de cultivo, incluso sin la presencia de raíces, fueron transferidos al sustrato y se mantuvieron bajo condiciones de luz, agua y temperatura controladas. En este proceso, se logró enraizar y aclimatar un 25% de los explantes transferidos. Por otro lado, luego de 15 días, un 10% de las yemas de *N. alpataco* encapsuladas en alginato lograron emerger de la matriz (Figura 3), un 20% desarrollaron callo dentro de la misma pero no convirtieron y el resto de los explantes presentaron oxidación de los tejidos.

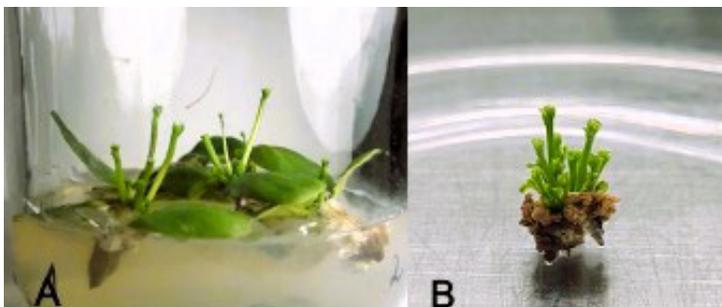


Figura 2 A. Brotes múltiples de *N. flexuosa*. **Figura 2 B.** Brotes múltiples de *N. caldenia* antes de elongar con callo en la base del explante.



Figura 3. Brote de *N. alpataco* emergiendo de semilla sintética

Para la germinación *in vitro* de semillas y obtención de plántulas de seibo, espinillo y cina-cina se observó que el medio MS/2 fue el más adecuado. El medio MS/2 adicionado con BAP (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) fue el más conveniente para el alargamiento de brotes preformados de las 3 tres especies. Dichos brotes se pasaron a medio de enraizamiento WPM/2 con NAA (0.1 mg/L) y se obtuvieron plantas completas que fueron aclimatadas a partir de los 40-70 días dependiendo de la especie (Cuadro 2). Se establecieron, por primera vez, los métodos para multiplicar *in vitro*, mediante microestaquillado, de estas especies (Figuras 4 A.B y C).

Especie	Material (explanto)	Medios de Cultivo		Aclimatación de plantas completas
		Inducción	Enraizamiento	
<i>Erythrina crista-galli</i> (seibo)	Secciones nodales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS/2 adicionado con BAP (1mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	WPM/2 adicionado con NAA (0,1mg/L)	a partir de los 25-30 días de iniciado el cultivo
<i>Vachellia caven</i> (espinillo)	Secciones nodales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS/2 adicionado con BAP (1mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	WPM/2 adicionado con NAA (0,1mg/L)	a partir de los 50 días de iniciado el cultivo

<i>Parkinsonia aculeata</i> (cina- cina)	Secciones nodales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS/2 adicionado con BAP (1mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	WPM/2 adicionado con NAA (0,1mg/L)	a partir de los 70 días de iniciado el cultivo
---	---	--	------------------------------------	--

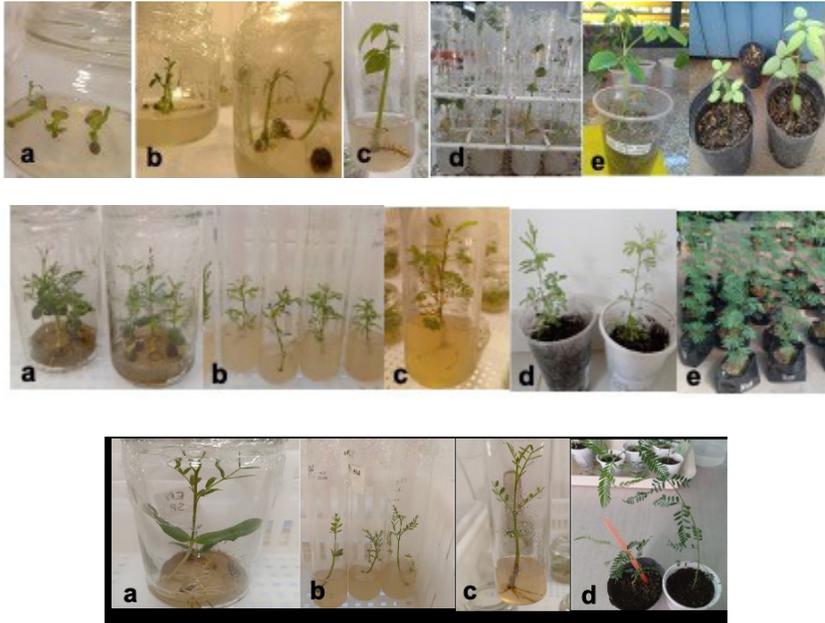


Figura 4. Microestaquillado de tres especies nativas de Argentina: A *Erythrina crista-galli* (seibo); B *Vachellia caven* (espinillo); C *Parkinsonia aculeata* (cina- cina)

Conclusiones

Con nuestro trabajo buscamos generar conocimiento para la caracterización, conservación *in situ* y *ex situ* y propagación de bajo costo, de germoplasma vegetal, con el fin de obtener material de propagación de calidad para procesos de restauración. Hasta el momento se ha logrado analizar la reproducción sexual por semillas de *P. tarapacana* ya que este conocimiento es imperativo para la conservación y restauración de los bosques nativos. Se micropropagaron plantas de *Neltuma*

alpataco, *N. caldenia*, *Geoffroea decorticans*, *Erythrina crista-galli* y *Parkinsonia aculeata*. El CTV, es una biotecnología simple que, en contexto de la Década de la restauración ecosistémica, se convierte en una poderosa herramienta para restaurar ecosistemas forestales degradados. La consolidación de mecanismos de propagación, domesticación y establecimiento a campo de los recursos genéticos, permite desarrollar programas de restauración ecosistémica a nivel nacional. Las actividades del proyecto también involucran el desarrollo de fichas técnicas, acompañamiento de la producción en vivero y la capacitación de RRHH.

Referencias

- Chapman, C.A., Chapman, L.J., Wingham, R., Hunt, K., Gebo D. & Gardner L. 1992. Estimators of fruit abundance of tropical trees. *Biotropica*, 24(4): 527-531. <https://doi.org/10.2307/2389015>
- Cordazzo C. V. (2002). Effect of seed mass on germination and growth in three dominant species in southern Brazilian coastal dunes. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 62(3), 427-435. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000300005>
- Cordazzo, C.V. (2002). Effect of seed mass on germination and growth in three dominant species in southern Brazilian coastal dunes. *Brazilian journal of biology*, 62(3), 427-435.
- Hitchmough, J. (2002). [Review of Grazing Ecology and Forest History, by F. W. M. Vera]. *Garden History*, 30(2), 263-263. <https://doi.org/10.2307/1587257>
- Hitchmough, J., & Vera, F. (2002). Grazing Ecology and Forest History. *Garden History*, 30, 263. <https://doi.org/10.2307/1587257>
- International Seed Testing Association ISTA. (2006). *ISTA Handbook on Seedling Evaluation, Third Edition* (ed. R. Don). International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Lloyd, G., & McCown, B. (1981). Commercially Feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society*, 30, 421-427.

- López, V. L., Botta, L., Martínez Pastur, G., Lencinas, M. V., Cuycens, G. A. E., & Cellini, J. M. (2023). Characterization of *Polylepis tarapacana* Life Forms in the Highest-Elevation Altiplano in South America: Influence of the Topography, Climate and Human Uses. *Plants*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/plants12091806>
- López, V. L., Huertas Herrera, A., Rosas, Y. M., & Cellini, J. (2022). Optimal environmental drivers of high-mountains forest: *Polylepis tarapacana* cover evaluation in their southernmost distribution range of the Andes. *Trees, Forests and People*, 9, 100321. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2022.100321>
- Marcora, P., Hensen, I., Renison, D., Seltmann, P., & Wesche, K. (2008). The performance of *Polylepis australis* trees along their entire elevational range: Implications of climate change for their conservation. *Diversity and Distributions*, 14, 630-636.
- Michel, B.E. & Kaufmann, M.R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51, 914-6.
- Moles, A. T., & Westoby, M. (2004). Seedling survival and seed size: A synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, 92(3), 372-383. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00884.x>
- Murashige, T., and Skoog, (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Renison, D., Cingolani, A. (1998). Experiencias en germinación y reproducción vegetativa aplicados a la reforestación con *Polylepis australis* (Rosaceae) en las Sierras Grandes de Córdoba, Argentina. *Agriscientia*, 15, 47-53. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v15.n0.2607>
- Seiwa, K., & Kikuzawa, K. (2011). Phenology of tree seedlings in relation to seed size. *Canadian Journal of Botany*, 69, 532-538. <https://doi.org/10.1139/b91-072>
- Seltmann, P., Cocucci, A., Renison, D., Cierjacks, A., & Hensen, I. 2009. Mating system, outcrossing distance effects and pollen availability in the wind-pollinated treeline species *Polylepis australis* BITT. (Rosaceae). *Basic and Applied Ecology*, 10, 52-60.

- Sharry, S., Adema, M., Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. EDULP. Argentina. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Villela, F.A., Doni, F.L., & Sequeira, E.L. (1991). Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26, 1957-1968.
- Villota, L., Torres-Romero, F., Rodríguez, E., Sánchez, J., Avella M., A. (2020). *Domesticación de plantas nativas empleadas en procesos de restauración ecológica. Un nuevo enfoque para la propagación y el viverismo*. Fundación Natura
- Zhang, S., Kang, H., & Yang, W. (2017). Climate change-induced water stress suppresses the regeneration of the critically endangered forest tree *Nyssa yunnanensis*. *PLOS ONE*, 12, e0182012.

CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA A OÍDIO EN VIDES DE VINO: GENERACIÓN DE NUEVAS VARIEDADES

Viviana Sosa¹, Lucina Romero-Romero² y Patricio Arce-Johnson^{1*}

RESUMEN

La vid es una de las especies frutales más importantes a nivel mundial y también para Chile. En nuestro país se exporta como uva de mesa para consumo en fresco y también es la base de la industria vitivinícola. Aproximadamente el 62% del área plantada se utiliza para la producción y exportación de vinos. En 2021, el país exportó 8,7 millones de hectolitros (mhl), lo que generó divisas por 2.883 millones de euros. Las principales variedades que tenemos son Cabernet Sauvignon (33%), Sauvignon Blanc (13%), Merlot (12%), Chardonnay (10%) y Carménère (8%). Sin embargo, la producción de este fruto requiere de aplicaciones de diversos pesticidas para controlar insectos, bacterias y hongos que lo afectan. En el caso de los hongos, el principal hongo precosecha que afecta a la vid es *Erysiphe necator*, causante de la enfermedad conocida como oídio. Las consecuencias de este hongo son una disminución del peso del racimo, un retraso en la maduración y una reducción de la tasa fotosintética y de transpiración. El rendimiento no es el único factor afectado; la calidad de la fruta también se reduce. *E. necator* afecta el contenido de azúcar, el nivel de acidez y la concentración de antocianinas de las uvas. Además, el oídio favorece el ataque de otros patógenos como *Botrytis cinerea*.

Actualmente no existen variedades comerciales de *Vitis vinifera* resistentes al oídio, por lo que el principal control de este hongo es mediante la aplicación de fungicidas a base de azufre. Estos productos tienen características químicas tóxicas para la salud humana y animal, son perjudiciales para el medio ambiente, son de alto costo y requieren

¹ Instituto de Ciencias Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile, Santiago 8380453, Chile. ²Cidiir Sinaloa, México 45150.

*patricio.arce@uautonoma.cl

una aplicación constante para controlar el patógeno. Por el número de aplicaciones, principio activo y concentración utilizada, estimamos que en Chile se utilizan anualmente 18 toneladas de fungicidas equivalentes a 52 millones de dólares para el control del oídio en la vid. Ante este escenario, es necesario encontrar formas de control del oídio que sean más inocuas para el hombre, los animales y el medio ambiente, y a su vez sean económicamente rentables y satisfagan los requerimientos de productores y consumidores. Para afrontar este problema, nuestro grupo de investigación mediante cruzamiento dirigidos asistidos por marcadores moleculares, desarrollamos nuevas variedades de vides de vino portadoras de los loci de resistencia genética a *E. necator*: Ren1 y Run1. Las plantas resistentes resultantes de los cruzamientos entre plantas portadoras de los loci Run1 y Ren1 con: Carménère, Merlot, Cabernet sauvignon, Sauvignon Blanc, Chardonnay y Pinot noir, fueron crecidas en invernadero y establecidas en terreno para evaluar su producción de fruta y calidad de vino.

PALABRAS CLAVE

Vides, resistencia a oídio, *Erysiphe necator*, fungicidas; vinificación.

Introducción

La vid es uno de los cultivos frutales más importantes a nivel mundial (OIV, 2019). En Chile existen 210.000 hectáreas (ha) plantadas de vid (OIV, 2021), de las cuales el 62% (130.086 ha) se destinan a la producción de vino (SAG, 2021). Actualmente, Chile es el cuarto exportador de vino a nivel global con 8,7 millones de hectolitros (mhl), lo que generó ingresos por 2.9 millones de euros (OIV, 2021). Las variedades de vino más destacadas en Chile son Cabernet Sauvignon (33%), Sauvignon Blanc (13%), Merlot (12%), Chardonnay (10%) y Carménère (8%) (SAG, 2021).

Muchos agentes bióticos afectan la producción de la vid a lo largo del ciclo de crecimiento de la planta (Armijo *et al.*, 2016). En el caso de la pre cosecha, la enfermedad más destructiva es el oídio, que es generado por el hongo biotrófico *Erysiphe necator* (sinónimo: *Uncinula*

necator) (Ferreira *et al.*, 2004). Este hongo se ha caracterizado como la enfermedad más crítica en términos de pérdidas económicas en precosecha (Bois *et al.*, 2017). Este hongo causa una disminución del peso del racimo, un retraso en su maduración (Reuveni & Reuveni, 1995), una reducción en la tasa fotosintética y de transpiración (Sh-tienberg, 1992). También se reduce la calidad de la fruta afectando el contenido de azúcar, el nivel de acidez (Gadoury *et al.*, 2012) y la concentración de antocianinas (Calonnec *et al.*, 2021) en las uvas. Adicionalmente, el oídio favorece el ataque de otros patógenos, como *Botrytis cinerea* (Pearson & Gadoury, 1992).

Además de los factores antes mencionados, la mega sequía que afecta a Chile por más de 10 años asociada al cambio climático, disminuye la efectividad del control químico. Las frecuentes lluvias fuera de temporada lavan las hojas y disminuyen la eficiencia de los fungicidas debido a que la mayoría de los productos utilizados para combatir este patógeno son de contacto, es decir, solo afectan el hongo en las superficies de la planta donde se aplican (Chakraborty *et al.*, 2000). El cambio climático no sólo dificulta el control de la enfermedad, sino que también favorece el aumento de la variabilidad genética de *E. necator*, ya que el aumento de la temperatura ambiental favorece la reproducción sexual del hongo frente a la asexual. Incrementando la probabilidad del desarrollo de nuevas cepas resistentes a agroquímicos (Legler *et al.*, 2012). Actualmente no existen variedades comerciales de *Vitis vinifera* resistentes al oídio, por lo que el principal control de este hongo es mediante la aplicación de fungicidas a base de azufre. Estos productos tienen características químicas tóxicas para la salud humana y animal, son nocivos para el medio ambiente, son costosos y requieren una aplicación constante para controlar el patógeno (Mostafalou *et al.*, 2017). Según nuestras estimaciones no publicadas, en base al número de aplicaciones, principio activo y concentración utilizada, en nuestro país se utilizan anualmente 18 toneladas de fungicidas equivalentes a 52 millones de dólares para el control del oídio en la vid.

Numerosas iniciativas internacionales lideradas por la comunidad europea buscan reducir al 30% el uso de pesticidas en la producción de

alimentos, incluida la vid. Una de las posibles formas de enfrentar este problema, es el desarrollo de nuevas variedades comerciales que tengan resistencia genética al hongo (Delrot *et al.*, 2020), ya que la mayoría de las variedades que actualmente se comercializan en el mundo para producir vino son altamente susceptibles (Gadoury *et al.*, 2003). De esta forma se pueden generar cultivares de uva resistentes a los hongos mediante mejoramiento convencional o con la ayuda de marcadores moleculares. Para ello, se realizan cruces dirigidos con especies relacionadas que portan loci de resistencia (Borrello *et al.*, 2021). Se han identificado en diferentes especies varios loci asociados con la resistencia al oídio. Estos loci han sido denominados Ren1 (Hoffman *et al.*, 2008), Ren1.2 (Possamai *et al.*, 2021), Ren2 (Dalbó *et al.*, 2001), Ren3 (Zendler *et al.*, 2017), Ren4 (Ramming *et al.*, 2011), Ren5 (Blanc *et al.*, 2012), Ren6 (Pap *et al.*, 2016), Ren10 (The *et al.*, 2017), Ren11 (Karn *et al.*, 2021), Run1 (Barker *et al.*, 2005), Run1.2a y b, Run2.1 y Run2.2 (Massonnet *et al.*, 2021; Maul *et al.*, 2021). Diversos programas de mejoramiento genético para vino y uva de mesa que actualmente se desarrollan a nivel global buscan generar variedades resistentes o tolerantes al oídio. Una iniciativa de colaboración internacional entre instituciones de EE. UU. y Europa ha creado el PMG PIWI (Pirrello *et al.*, 2023). Producto de esta colaboración se han registrado cultivares de vino con un nivel variable de resistencia genética al oídio, entre los que destacan: 'Seyval Blanc' (Francia), 'Regent' (Alemania, PIWI), 'Solaris' (Alemania, PIWI), 'Johanniter' (Alemania, PIWI), 'Phoenix' (Alemania), 'Cabernet Cortis' (Alemania, PIWI) (Pirello y col., 2023) y 'Arandell' (EE.UU.) (Reisch & Luce, 2014). Sin embargo, al ser plantas híbridas entre *V. vinifera* y otras especies, su uso es limitado en muchos países, incluido Chile, debido a una estricta legislación que solo permite la producción de vino a partir de la especie *Vitis vinifera* (Alston & Gaeta, 2021). Sin embargo, en los últimos años se han descrito genes de resistencia a hongos dentro del género *Vitis*, incluida la familia de genes Run y Ren (Sosa-Zúñiga *et al.*, 2022). En el presente trabajo hemos los genes Run1 y Ren1 para la generación de plantas de vides más tolerantes o resistentes a oídio, conservando las características del género *Vitis*, como una alternativa más amigable con el medio ambiente para combatir contra el hongo responsable *E. necator*.

Materiales y métodos

Recolección y almacenamiento de polen

Se realizaron cruces entre diferentes progenitores tintos y blancos resistentes al oídio (Run1Ren1), con plantas sensibles Carménère, Merlot, Pinot noir, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc y Chardonnay (Agurto *et al.*, 2017, Soza-Zuniga *et al.*, 2022). También se utilizó el parental blanco resistente al oídio P09-106-7 (Run1Ren1), que se cruzó con Sauvignon Blanc. Para ello en el mes de octubre se recolectó polen de plantas de 8 años establecidas en la localidad de Miraflores Curacaví a partir de inflorescencias cuyas flores estaban naturalmente abiertas (flor completa) en días calurosos y secos. Las inflorescencias se agitaron dentro de un frasco de vidrio esterilizado, pegando el polen a sus paredes y a la base del frasco. El polen recolectado se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso en el mes de noviembre del mismo año. El polen también se guardó en frigorífico durante un año para utilizarlo en la siguiente temporada.

Emasculación de flores y polinización

Las flores de las plantas utilizadas son hermafroditas, y fueron emasculadas previo a la antesis. Para ello, con mucho cuidado y ayuda de unas pinzas, se retiraron las caliptras (pétalos fusionados) y anteras, quedando las flores como femeninas. Posteriormente, las inflorescencias emasculadas se cubrieron con una bolsa de papel hasta la polinización, lo que ocurrió 4-5 días después de la emasculación. Cuando las flores madre estaban receptivas, lo que se reconoce por la presencia de una gota de savia en el estigma de la flor, se realizó la polinización manual aplicando el polen de la variedad de interés con un pincel.

Recolección de racimos y rescate de semillas

Luego de la polinización, los racimos fueron cubiertos con bolsas de papel permitiendo el crecimiento del fruto, durante aproximadamente

tres meses post polinización. Una vez cuajados los frutos, se retiró la bolsa de papel para que los racimos se desarrollen expuestos a la radiación ambiental. En cada racimo se dejó una etiqueta marcando el cruce realizado. Los frutos una vez maduros se cosecharon, extrajeron sus semillas, las que se lavaron, secaron y almacenaron a 4 °C en una cámara de frío hasta su utilización.

Germinación de semillas de cruces y generación de plantas segregantes

Para la germinación de las semillas se debió estratificarlas previamente en un ambiente frío (4 °C) y húmedo durante dos meses. Este proceso se realizó en platos o cajas esterilizadas, cubiertas con papel absorbente húmedo, cambiando semanalmente el papel toalla y aplicando fungicida para evitar infecciones fúngicas. Pasado este tiempo, las semillas se sembraron en cajas de plástico cerradas con sustrato estéril. El sustrato consistió en una mezcla de turba y vermiculita en proporción 1:1. Las cajas se guardaron en invernadero, dentro de camas calientes, cuidando de mantener la humedad. Una vez que las plantas emergieron y alcanzaron 6 cm de altura, se trasplantaron a vasos de 1 litro con el mismo sustrato y se mantuvieron en invernadero a un rango de temperatura entre 25-35 0C.

Caracterización fenotípica y genotípica del material vegetal

El fenotipo del material vegetal se evaluó mediante la inoculación de cinco discos foliares de cada planta con el hongo *E. necator*, siguiendo la metodología descrita en Soza-Zuniga *et al.*, 2022. Las hojas utilizadas para el experimento fueron seleccionadas según el criterio de ser hojas de similar tamaño y edad del tercio superior de la planta. La inoculación se realizó mediante contacto suave del lado abaxial de los discos foliares con tejido infectado de otras vides que presentaban esporas visibles. Los discos de hojas de las plantas de vides infectadas para su análisis se obtuvieron con un sacavocado (1 cm de diámetro. Se prefirió el uso de discos de hojas al de hojas enteras porque esto per-

mitió una mayor estandarización de las muestras). Los discos foliares se mantuvieron en placas de Petri en una cámara de crecimiento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Diez días después de la inoculación (dpi), la presencia de infección de oidio en los discos foliares se evaluó mediante inspección visual y luego se corroboró con una lupa. Las muestras de hojas utilizadas para el análisis fenotípico fue tejido fresco del que se extrajo DNA.

Tanto el material vegetal como el material fúngico fue proporcionado por la empresa AgriJohnson, Ltda. ubicado en la comuna de Curacaví, Región Metropolitana de Santiago de Chile. Esta empresa cuenta con todos los genotipos de vides y también la población de vides segregantes y resistentes a este hongo.

Resultados y discusión

Cruzamientos de parentales y obtención de plantas segregantes de vides de vino

A partir de cruzamientos entre diferentes parentales de vides de vino resistentes y cultivares de vino sensibles al hongo *E. necator*, se realizaron cruzamientos dirigidos en el mes de noviembre de 2014 en la localidad de Curacaví, Región Metropolitana de Santiago de Chile. Se recolectaron los racimos maduros producto de los cruzamientos entre febrero y abril del año 2015. Para la obtención de plantas de vides resistentes, se utilizaron como plantas susceptibles al hongo *E. necator* que crecían en campo de los cultivares: Carménère, Cabernet Sauvignon, Sauvignon blanc, Chardonnay, Pinot noir y Merlot. Estas fueron emasculadas y cruzadas con polen de genotipos de vid resistentes a oidio que portan los genes Run1Ren1. Posteriormente, las inflorescencias de las vides polinizadas, fueron protegidas con una bolsa de papel para evitar polinización cruzada, hasta que se visualizaran bayas cuajadas (no mostrado). Una vez generados los racimos de uvas producto del cruzamiento dirigido, se espero hasta la maduración de las bayas y estas fueron cosechados. En el laboratorio se procedió a obtener las semillas y estas se lavaron y al-

macenaron a 2 °C durante tres meses. Una vez cumplido su período de estratificación en frío, las semillas de los diferentes cruzamientos se hicieron germinar en sustrato (80 turba: 20 perlita) al interior de cajas transparentes en cámara de crecimiento a 25 °C. El porcentaje de germinación obtenido dependió del cruce y de la calidad de las semillas tras el tratamiento de estratificación. Sin embargo estos obtuvieron en un rango entre 20% de germinación para cruzamientos de Chardonnay con parentales resistentes a un 62% de germinación en cruzamientos de Carménère y parentales resistentes (no mostrado). En base a las semillas germinadas finalmente se obtuvieron plantas de estos cruzamientos que oscilaron entre 5 a 171 dependiente del cruzamiento (Tabla 1). A modo de resumen pudimos generar sobre 900 plantas segregantes adultas productos de estos cruzamientos (Tabla 1), las que fueron fenotípica genotípicamente analizadas para la resistencia al hongo *E.necator*.

Análisis fenotípico y genotípico de plantas de vid de vino resistentes a oídio

El análisis fenotípico y genotípico de plantas de vid de vino resistentes a oídio, se inició con la inoculación de discos de hojas con *E. necator*. Posteriormente, se evaluaron los síntomas de infección bajo lupa estereoscópica. En el análisis de fenotipo, los discos foliares de plantas resistentes fueron asintomáticas para la infección con *E. necator*, sin evidencias visibles de oídio a los 10 dpi. Sin embargo, los discos foliares de las plantas controles sensibles del cultivar Carménère, mostraron los primeros signos visibles (polvo blanco grisáceo en las hojas) a los 7 dpi, y todos los discos mostraron síntomas a 10 dpi. Resultados similares se observaron en toda la planta (Figura 1A). Dado que la resistencia proporcionada por Run1 y Ren1 genera una ausencia total de síntomas (Agurto *et al.*, 2017), la falta de síntomas era un resultado esperado de este experimento. Posteriormente, se evaluó la presencia de los loci Run1 y Ren1 mediante un análisis genotípico SSR para corroborar los resultados del fenotipo. En el caso de plantas con fenotipo susceptible, SSR detectó la falta de los

loci Run1 y Ren1 (Figuras 1B, C), mientras que la presencia de los loci Run1 y Ren1 se asoció exclusivamente con vides resistentes a oídio (Figuras 1D, E). Estos resultados mostraron que la presencia de Run1 y Ren1 confieren resistencia a la infección por *E. necator*, como se describió anteriormente (Agurto *et al.*, 2017).

Tabla 1. Resumen de Cruzamientos realizados entre vides de vino resistentes y sensibles a Oídio

Madre	Pólen (padre)	Racimos Polizados	No Semillas	No Plantas
P09-106-31	Merlot	1	39	14
	Cabernet Sauvignon	4	153	54
	Carménère	1	34	12
P09-106-18	Merlot	1	22	8
	Cabernet Sauvignon	1	65	23
	Carménère	2	167	59
P09-106-10	Merlot	3	111	39
	Cabernet Sauvignon	2	33	12
	Carménère	3	179	63
P09-105-59	Merlot	1	34	12
	Cabernet Sauvignon	1	23	8
	Carménère	1	167	59
P09-105-34	Merlot	1	56	20
	Carménère	1	73	26
P09-106-7	Pinot Noir	4	616	36
	Sauvignon Blanc	1	120	73
	Chardonnay	3	327	61
P09-106-40	Pinot Noir	5	1003	162
P09-106-9	Pinot Noir	3	179	171
Chardonnay	P09-106-7	6	253	5
Total		45	3654	917

Establecimiento en campo de plantas segregantes de vides de vino resistentes y micrvinificación

Con base en sus características fenotípicas de ausencia de síntomas visibles de oídio en discos de hojas verificados en lupa, y detección

positiva de los dos marcadores moleculares utilizados para el análisis genotípico, se seleccionaron plantas segregantes de vides de vino resistentes las que fueron establecidas en campo en octubre del año 2015 hasta que estas produjeran fruta para ser micro vinificada.

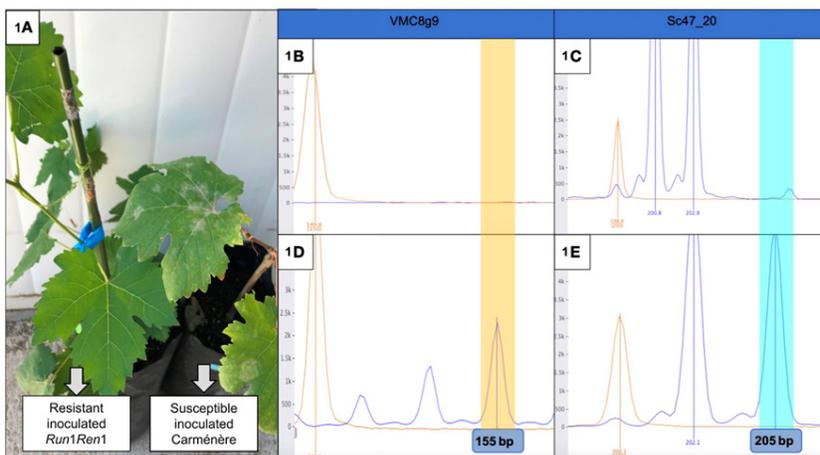


Figura 1. Análisis fenotípico y genotípico de plantas P09-105-59 y Carménère.

(A) Foto de las plantas inoculadas Run1Ren1 P09-105-59 resistente (izquierda) y Carménère susceptible (derecha). La primera planta no mostró ningún síntoma visible de oídio, a diferencia de la segunda planta, que tuvo una perceptible presencia de estructuras de hongos (polvo blanco/gris); (B–E) Electroforetograma de análisis SSR de plantas Carménère resistentes y susceptibles. VMC8g está vinculado a Run1, y Sc47_20 está vinculado a Ren1. El genotipo resistente P09-105-59 portaba Run1 (D) y Ren1 (E), en cambio, Carménère no porta ninguno de ellos (B, C). Los fragmentos polimórficos para VMC8g9 (155 pb) y Sc47_20 SSR (205 pb) están resaltados en amarillo y azul, respectivamente (Sosa-Zuniga *et al.*, 2022).

Para una evaluación preliminar del tipo de mosto y vino generado por estas selecciones se realizó en dos ocasiones un proceso de micro vinificación. En otoño de 2020 se cosecharon más de 100 kilos de uva del Genotipo Pinot noir con doble resistencia a *E. necator*. Se realizó una vinificación con la empresa Sidal de Casablanca, se obtuvieron más de 80 litros de mosto a partir del cual se obtuvo un vino rosado. Se obtuvieron los análisis químico-físicos del vino producido. En

otoño de 2022 se cosecharon más de 10 kilos de los genotipos tipo Chardonnay con doble resistencia a *E. necator*. En esta ocasión la uva se procesó en el Centro del Vino de la Universidad de Talca, en donde se realizó un micro vinificación manual, a partir de la cual se obtuvo un vino blanco. Los informes químicos de ambos vinos como la degustación por un panel evaluador, concluyeron que la planta segregante resistente que generó un vino blanco fue de excelente calidad comparable a buenos vinos comerciales. Con ello, se podrá avanzar en la caracterización de estas líneas avanzadas, elaboración de vino en condiciones de campo a escala semicomercial y posible registro de una nueva variedad de vid de vino resistente a oídio que no requiera de aplicación de fungicida para el control del hongo *E. necator*.

Conclusiones

Mediante la implementación de un programa de mejoramiento genético de vides de vino para conferir resistencia al hongo *E. necator*, responsable de la enfermedad conocida como oídio, se pudieron generar plantas resistentes portadoras de los genes Ren1 y Run1. A partir de una de las selecciones avanzadas, se pudo generar un vino blanco de excelentes atributos organolépticos, similares a buenos vinos comerciales. Actualmente se está evaluando en condiciones de producción semi comercial previo a su registro como nueva variedad de uva de vino resistente a oídio.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al proyecto Anid Investigación Tecnológica 2023 código: IT23I0007.

Referencias

Agurto, M., Schlechter, R.O., Armijo, G., Solano, E., Serrano, C., Contreras, R.A., Zúñiga, G.E., & Arce-Johnson, P. (2017). RUN1

- and REN1 Pyramiding in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Crimson Seedless) Displays an Improved Defense Response Leading to Enhanced Resistance to Powdery Mildew (*Erysiphe necator*). *Frontiers in Plant Science*, 8, 758. doi: 10.3389/fpls.2017.00758
- Alston, J. M., & Gaeta, D. (2021). Reflections on the Political Economy of European Wine Appellations. *Italian Economic Journal*, 7(2), 219-258. <https://doi.org/10.1007/s40797-021-00145-4>
- Armijo, G., Espinoza, C., Loyola, R., Restovic, F., Santibáñez, C., Schlechter, R., Agurto, M., & Arce-Johnson, P. (2016). Grapevine Biotechnology: Molecular Approaches Underlying Abiotic and Biotic Stress Responses. En A. Morata & I. Loira (eds.) *Grape and Wine Biotechnology*. InTechOpen. doi: 10.5772/61694.
- Barker, C.L., Donald, T., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M.B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.-F., Thomas, M.R., & Dry, I. (2005). Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(2), 370-377. doi: 10.1007/s00122-005-2030-8
- Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dumas, V., Mestre, P., & Merdinoglu, D. (2012). A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of Ren5, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(8), 1663-1675. doi: 10.1007/s00122-012-1942-3
- Bois, B., Zito, S., & Calonnec, A. (2017). Climate vs grapevine pests and diseases worldwide: The first results of a global survey. *OENO One*, 51(2), 133. doi: 10.20870/oeno-one.2016.0.0.1780
- Borrello M., Cembalo L., & Vecchio R. 2021. Consumers' acceptance of fungus resistant grapes: Future scenarios in sustainable wine-making. *Journal of Cleaner Production*, 307, 20, 127318.
- Calonnec, A., Jolivet, J., Ramarason, M., Dufour, M., & Corio-Costet, M. (2021). Defence responses of grapevine cultivars to powdery mildew: Ontogenic resistance versus genetic resistance. *Plant Pathology*, 70(7), 1583-1600. doi: 10.1111/ppa.13404

- Chakraborty, S., Tiedemann, A. V., & Teng, P. S. (2000). Climate change: Potential impact on plant diseases. *Environmental Pollution*, 108(3), 317-326. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00210-9)
- Dalbó, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Wilcox, W.F., & Reisch, B.I. (2001). Marker-assisted Selection for Powdery Mildew Resistance in Grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(1), 83-89. doi: 10.21273/JASHS.126.1.83
- Delrot, S., Grimplet, J., Carbonell-Bejerano, P., Schwandner, A., Bert, P.-F., Bavaresco, L., Costa, L. D., Di Gaspero, G., Duchêne, E., Hausmann, L., Malnoy, M., Morgante, M., Ollat, N., Pecile, M., & Vezzulli, S. (2020). Genetic and Genomic Approaches for Adaptation of Grapevine to Climate Change. En C. Kole (ed.), *Genomic Designing of Climate-Smart Fruit Crops* (pp. 157-270). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97946-5_7
- Ferreira, R.B., Monteiro, S.S., Piçarra-Pereira, M.A., & Teixeira, A.R. (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology*, 22(4), 168-173. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.02.001
- Gadoury, D.M., Seem, R.C., Ficke, A., & Wilcox, W.F. (2003). Ontogenic Resistance to Powdery Mildew in Grape Berries. *Phytopathology*, 93(5), 547-555. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.5.547
- Gadoury, D.M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W.F., Dry, I.B., Seem, R.C., & Milgroom, M.G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): A fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph: Grapevine powdery mildew. *Molecular Plant Pathology*, 13(1), 1-16. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R., & Kozma, P. (2008). Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik*, 116(3), 427-438. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0680-4>

- Karn, A., Zou, C., Brooks, S., Fresnedo-Ramírez, J., Gabler, F., Sun, Q., Ramming, D., Naegele, R., Ledbetter, C., & Cadle-Davidson, L. (2021). Discovery of the REN11 Locus From *Vitis aestivalis* for Stable Resistance to Grapevine Powdery Mildew in a Family Segregating for Several Unstable and Tissue-Specific Quantitative Resistance Loci. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 733899.
- Legler, S. E., Caffi, T., & Rossi, V. (2012). A nonlinear model for temperature-dependent development of *Erysiphe necator* chasmothecia on grapevine leaves: Temperature and ascocarp development in *Erysiphe necator*. *Plant Pathology*, *61*(1), 96-105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02498.x>
- Massonnet, M., Vondras, A. M., Cochetel, N., Riaz, S., Pap, D., Minio, A., Figueroa-Balderas, R., Walker, M. A., & Cantu, D. (2021). Characterization of the grape powdery mildew genetic resistance loci in *Muscadinia rotundifolia* Trayshed. *G3 Genes | Genomes | Genetics*, *12*(8), <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac148>
- Maul, E., Sudharma, K., Ganesh, A., Hundemer, M., Kecke, S., Marx, G., Schreiber, T., Walk, M., vom Weg, S., Mahler-Ries, A., Brühl, U., & Töpfer, R. (2021). *Vitis International Variety Catalogue*. <https://www.vivc.de/>
- Mostafalou, S., Abdollahi, M. (2017). Pesticides: An update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, *91*(2), 549-599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- OIV. (2021). *State of the World Viticultural Sector in 2020*. Available online: <https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-viticultural-sector-in-2020.pdf> (accessed on 12 December 2021).
- Pap, D., Riaz, S., Dry, I., Jermakow, A., Tenschler, A., Cantu, D., Oláh, R. & Walker, M. A. (2016). Identification of two novel powdery mildew resistance loci, Ren6 and Ren7, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biol*, *16*, 170 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0855-8>
- Pearson, R.C., & Gadoury, D.M. (1992). *Powdery mildew of grape: Vol. 3. Diseases of fruit crops* (Kumar, J., Chaube, H.S., Singh, U.S., Mukhopadhyay, A.N.). Prentice Hall.

- Possamai, T., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Migliaro, D., De Mori, G., Cipriani, G., Velasco, R., & Testolin, R. (2021). Construction of a high-density genetic map and detection of a major QTL of resistance to powdery mildew (*Erysiphe necator*Sch.) in Caucasian grapes (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, *21*(1), 528. doi: 10.1186/s12870-021-03174-4
- Ramming, D.W., Gabler, F., Smilanick, J., Cadle-Davidson, M., Barba, P., Mahanil, S., & Cadle-Davidson, L. (2011). A Single Dominant Locus, Ren4, Confers Rapid Non-Race-Specific Resistance to Grapevine Powdery Mildew. *Phytopathology*, *101*(4), 502-508. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0237
- Reisch B., Luce R. And Mansfield A. 2014. Arandell- a disease resistant red wine grape. *Horticultural Science*, *49*(4),503-505
- Reuveni, M., & Reuveni, R. (1995). Efficacy of foliar applications of phosphates in controlling powdery mildew fungus on field-grown winegrapes: Effects on cluster yield and peroxidase activity in berries. *Journal of Phytopathology*, *143*(1), 21-25 DOI:10.1111/j.1439-0434.1995.tb00194.x
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2021). <http://www.sag.gob.cl/content/catastro-viticola-nacional-2021>.
- Shtienberg, D. (1992). Effects of foliar diseases on gas exchange processes: A comparative study. *Phytopathology*, *82*(7), 760-765.
- Sosa-Zuniga, V., Martínez-Barradas, V., Espinoza, C., Tighe-Neira, R., Valenzuela, Á. V., Inostroza-Blancheteau, C., & Arce-Johnson, P. (2022). Characterization of physiological and antioxidant responses in *Run1Ren1 Vitis vinifera* plants during *Erysiphe necator* attack. *Frontiers in plant science*, *13*, 964732. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.964732>
- Sosa-Zúñiga V, Vidal A , Barba P, Espinoza C , Romero-Romero JL, & Arce-Johnson P. (2022b). Powdery Mildew Resistance Genes in Vines: An Opportunity to Achieve a more sustainable viticulture. *Pathogens* *2022*, *11*(6), 703; <https://doi.org/10.3390/pathogens11060703>
- Teh, S. L., Fresnedo-Ramírez, J., Clark, M. D., Gadoury, D. M., Sun, Q., Cadle-Davidson, L., & Luby, J. J. (2017). Genetic dissection

of powdery mildew resistance in interspecific half-sib grapevine families using SNP-based maps. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement*, 37(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0586-4>

Zendler, D., Schneider, P., Töpfer, R. & Zyprian, E. (2017). Fine mapping of Ren3 reveals two loci mediating hypersensitive response against *Erysiphe necator* in grapevine. *Euphytica*, 213, 68. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1857-9>

Zyprian, E., Ochßner, I., Schwander, F., Šimon, S., Hausmann, L., Bonow-Rex, M., Moreno-Sanz, P., Grandó, M. S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Eibach, R., & Töpfer, R. (2016). Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 291(4), 1573–1594. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1200-5>

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO PARA CONTENIDO DE CIANURO EN CLONES DE YUCA

María Alejandra Ospina^{1*}, Anestis Gkanogiannis¹, Luis Londoño¹, Thierry Tran², Sandra Salazar¹, Johanatan Newby¹ y Luis Augusto Becerra Lopez-Lavalle¹

RESUMEN

El cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se considera de gran importancia para la seguridad alimentaria debido a que es la cuarta fuente de energía más importante para millones de personas de países tropicales. Un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) se llevó a cabo para mapear loci de rasgos cuantitativos asociados con el contenido de cianuro en hojas y raíces de yuca un importante parámetro de calidad poscosecha, se utilizaron 230 genotipos de yuca con origen de diferentes países, una muestra representativa de la diversidad de germoplasma en la colección de yuca de CIAT. El estudio de GWAS utilizó 69.132 marcadores SNPs y un modelo MLM: PCA + K en el software TASSEL. Como resultado, se identificó que el contenido de HCN en las hojas de yuca varió de 538 ppm a 6181 ppm, mientras que en las raíces de yuca el contenido de HCN osciló desde 26 ppm a 1346 ppm. Se identificó una región genómica en el cromosoma 13 y 11 con cuatro SNPs significativamente asociados con el contenido de HCN. Una búsqueda en el genoma de la yuca ubicó estos SNPs en las cercanías de los genes Manes.13G079400, Manes.13G078400, Manes.13G084300, Manes.11G104200 y Manes.11G104100. Este estudio proporcionó información sobre la aplicación práctica de GWAS para diseccionar la base genética de los rasgos cuantitativos en la yuca. Los hallazgos presentados aquí ofrecen una base práctica para mejorar el contenido de HCN en la yuca a través de la selección

¹ Alianza Bioersity - CIAT, Programa Yuca, 763531 Palmira, Colombia.

* maospinap@gmail.com

² CIRAD, UMR QualiSud, F-34398 Montpellier, France.

asistida por marcadores y la selección genómica. Esta información es útil para ser aprovechada en el mejoramiento de genotipos de yuca que se adapten a los nuevos requerimientos de productividad futura, nutrición y el medio ambiente.

PALABRAS CLAVE

Cianuro, Genes, GWAS, SNPs, Yuca.

Introducción

La yuca se cultiva y se consume ampliamente en las regiones tropicales de África, Asia y América Latina, donde proporciona seguridad alimentaria familiar a comunidades agrícolas (Monfreda *et al.*, 2008; Salvador *et al.*, 2014). Sin embargo, la naturaleza heterocigota intrínseca, los largos ciclos de reproducción y la alta sensibilidad a las variaciones ambientales hacen que la yuca sea un cultivo difícil de mejorar convencionalmente (Ceballos *et al.*, 2015).

Como cultivo cianogénico, la yuca tiene la capacidad de liberar cianuro de hidrógeno (HCN) durante el daño celular (Iglesias, Sánchez y & Yeoh, 2002). La variación entre los cultivares en cuanto a su potencial cianogénico causa expectación sobre los posibles efectos perjudiciales sobre la salud. El contenido de HCN en la yuca es un rasgo cuantitativo (Dixon, Asiedu y & Bokanga, 1994), dado que la reproducción convencional no ha sido efectiva con loci de rasgos cuantitativos (QTL) de baja heredabilidad, se espera que el mejoramiento molecular sea un método de mejoramiento eficiente (Collard *et al.*, 2005; Xinyou *et al.*, 2003).

No obstante, los avances recientes en las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han hecho que el análisis de asociación del genoma basado en el desequilibrio de ligamiento (GWAS) sea una herramienta favorable para mapear rasgos complejos en plantas superiores (Davey *et al.*, 2011). Con más del 97% del genoma de la yuca secuenciado (Prochnik *et al.*, 2012), ahora es posible utilizar GWAS (Oliveira *et al.*, 2012) para anclar con precisión polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) vinculado a los

rasgos de interés. De hecho, estas plataformas hacen que sea fácil inferir funciones de tales polimorfismos basados en anotaciones de las regiones genómicas donde están posicionadas. En este contexto, el objetivo de este estudio es identificar las regiones genómicas y los SNP vinculados a las variaciones naturales del contenido de HCN en genotipos de yuca.

Metodología

Las plantas utilizadas en este estudio fueron sembradas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical localizado a 1100 m.s.n.m en Palmira, Colombia (03° 25'N; 76° 35'W) y se cosecharon cuando tenían aproximadamente 11 meses de edad fisiológica durante tres ciclos de cosecha. Los 236 genotipos se agruparon en siete grupos de diversidad para su estudio como se reporta en la Tabla 1. La variación en el número de genotipos de diferentes países es representativa de la diversidad de germoplasma en la colección de yuca. Los análisis que se realizaron se basaron en la evaluación de 16 plantas por cada genotipo durante tres años de cosecha.

Determinación del contenido de materia seca

Se tomó una muestra de raíces frescas para la cuantificación del contenido de materia seca (%Ms). Para su estimación, se secó aproximadamente 5 g de tejido de raíz cortada y rallada en un horno a 105°C durante 24 h. La materia seca se expresó como el porcentaje de peso seco respecto al peso fresco:

$$\% \text{Materia Seca} = (\text{Peso fresco de la muestra}) / (\text{Peso seco de la muestra}) \times 100 \quad \text{Ec.1.1}$$

Cuantificación del contenido de ácido cianhídrico (HCN)

La cuantificación de HCN total se realizó según metodología descrita por Essers *et al.*, (1993). Primero se homogenizó 40g de pulpa a temperatura ambiente con 50 ml de medio de extracción, durante 3

min. Se tomó una alícuota del homogenizado y se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm a 25°C. Se tomó 0.1 ml del extracto anterior y se agregó a tubos con 0.4 ml de solución tampón fosfato 0.1 M pH 7. Después, se agregó 0.1 ml de enzima linamarasa y se colocó a incubar a 30°C durante 15 min. Una vez terminada la reacción, se agregó 0.6 ml de NaOH 0.2 M y se esperó 5 min a temperatura ambiente para después agregar 2.8 ml de solución tampón fosfato 0.1 M pH 6.0. En el análisis espectrofotométricamente se agregó 0.1 ml de cloramina T, y luego de 5 min, se adicionó 0.6 ml del reactivo Isonicotinato/1,3-dimetil barbiturato. Después de 10 min, se leyó la absorbancia a 605 nm.

Cálculos para determinar contenido de cianuro:

$$\text{Contenido HCN (ppm)} = \frac{10 \times V_{\text{extracción}} \times A_{620} \times Fd}{A_{\text{equivalente}} \times P_{\text{seco}}} \quad \text{Ec.1.2}$$

$V_{\text{extracción}}$ = Volumen ajustado + (PF - ((MS*PF)/100))

A_{605} = Promedio de absorbancias de la muestra a 605 nm

Fd = Factor dilutor

PF = Peso Fresco de la muestra

MS = Porcentaje del contenido de materia seca de la muestra

Aequiv = Absorbancia equivalente de ug de HCN a 605 nm

PS = Peso seco de la muestra (MS*PF)/100

Genotipado de polimorfismo de nucleótido único (SNP)

El ADN genómico total se extrajo de las hojas de yuca recién expandidas de acuerdo con el procedimiento descrito por Doyle & Doyle, (1990). Se realizó secuenciación genética con metodología de RAD Sequencing en el Instituto de Genómica de Beijing (BGI), esta técnica consiste en la digestión de ADN genómico, de múltiples muestras de interés con enzimas de restricción seleccionadas, y adaptadores con etiquetas específicas de las muestras, con terminaciones salientes que corresponden al sitio de corte de la enzima de restricción, que son ligados a los fragmentos de restricción digeridos (Davey *et al.*, 2013). Estos adaptadores son cortados a un tamaño adecuado (típicamente de 300-700pb) para secuenciación con Illumina mediante síntesis. Una

vez obtenidas las secuencias, se utilizó el software NGSEP (Next Generation Sequencing Eclipse Plugin) (Cruz *et al.*, 2014) para mapear las secuencias crudas de illumina a la versión actualizada del genoma de referencia AM560-2 vs 6.1 (Prochnik *et al.*, 2012) disponible en Cassava Genome HUB (<https://www.cassavagenome.org>), con el propósito de identificar SNPs entre los genomas en estudio y el genoma de referencia, generando un catálogo de variantes y obteniendo los genotipos correspondientes a cada muestra. La visualización grafica de estos SNPs se realizó en el programa FLAPJACK (Milne *et al.*, 2010). La herramienta TASSEL-GBS se utilizó para hacer SNP siguiendo los procedimientos bioinformáticos descritos en Elshire *et al.*, (2011) y Glaubitz *et al.*, (2014). Para eliminar sitios no segregados y no informativos, los datos imputados se filtraron adicionalmente en los siguientes umbrales: frecuencia de alelos minoritarios (MAF) = 0,01, recuento mínimo de genotipos = 50 y proporción heterocigota mínima = 0,01.

Estructura de la población

Para contabilizar los falsos positivos en GWAS, se investigó la estructura de la población en el panel utilizando el programa STRUCTURE (versión 2.3.4). La probabilidad de pertenencia para cada genotipo en una cantidad de subpoblaciones hipotéticas (k) se estimó utilizando marcadores de SNP. Las subpoblaciones 1-7 se probaron usando un modelo de mezcla. Se utilizó el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) con 100.000 repeticiones. El número más probable de subpoblaciones se determinó usando el Δk (Evanno *et al.*, 2005). La estructura de la población se siguió investigando utilizando el análisis de coordenadas principales. La matriz de parentesco (K) se estimó en TASSEL y se usó como covariable para controlar los falsos positivos en el análisis del rasgo del marcador.

Análisis de asociación de elementos SNPs

Los estudios de asociación del rasgo-marcador se llevaron a cabo en la versión 4 de TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007). En TASSEL, los modelos: GLM, GLM + Q, GLM + PCA, MLM + Q + K, MLM + PCA + K se

probaron para descubrir asociaciones verdaderas de rasgo-marcador y garantizar la efectividad en el control de falsos positivos. Los resultados mostraron que los modelos GLM no eran lo suficientemente buenos para controlar los falsos positivos (datos no presentados), por lo tanto, MLM + Q + K como MLM + PCA + K resultaron efectivos para encontrar asociaciones verdaderas. Además, los resultados de ambos modelos de MLM fueron similares, por lo tanto, MLM + PCA + K se usó en el estudio actual. Los alelos de SNP <0,05 de frecuencia se trataron como alelos menores, por lo que se eliminaron del análisis las variantes raras que tenían alelos menores. Las variantes con > 10% de SNP faltantes también se descartaron del análisis. El pFDR ($q < 0.05$) se aplicó para probar la significación estadística de las comparaciones múltiples de todos los marcadores detectados según Storey, (2002). Los datos de salida incluyeron R^2 (% de variación fenotípica explicada por marcadores significativos), los efectos aditivos donde un valor positivo indica la presencia de alelos que potencian la asociación con el contenido de cianuro y un valor negativo indica la presencia de alelos que reducen la asociación con las variaciones en el contenido de cianuro. La secuencia de SNPs significativos se sometió a búsquedas BLAST, para anotar los genes predichos.

Modelo de mapeo de la asociación

Las evaluaciones del modelo de mapeo de asociación se basaron en el gráfico quantile-quantile (Q-Q plot), que es un gráfico de los valores observados de $-\log_{10} P$ frente a los valores esperados de $-\log_{10} P$ bajo la hipótesis nula de que no hay asociación entre un SNP y el fenotipo. El enfoque utilizado para identificar las señales de GWAS se basó por completo en los valores de P más pequeños obtenidos del MLM, donde los SNPs se clasificaron en función del orden ascendente de sus valores de P . Los SNPs con valores de P inferiores al umbral de Bonferroni al 5% se consideraron significativamente asociados con los fenotipos. Además, las señales de asociación de los cromosomas se visualizaron a partir de gráficos de Manhattan generados utilizando *qqman* en el paquete de software R (Turner, 2014).

Se examinó la secuencia del genoma de referencia de yuca utilizando cassava genome Hub para buscar genes modelo en las proximidades de SNPs significativos. Para superar los problemas de no colinealidad que pueden existir dentro de esta versión del genoma (dado que solo está parcialmente completa), se consideraron intervalos más amplios (hasta 0,5 Mb) mientras se buscaban genes de vía en las cercanías de SNPs que mostraran asociaciones significativas.

Resultados y discusión

En el análisis de MLM para HCN, se detectó una fuerte señal de GWAS (Figura 1) y el análisis de los cromosomas mapeó la señal en el cromosoma 13 y 11 del genoma de la yuca (Figura 2). Dentro de esos picos, cuatro SNPs tenían P valores menores que el 5% del umbral de Bonferroni de significancia de todo el genoma. Los análisis de MLM indicaron el más alto $-\log_{10}(P)$ para el marcador S13_12562917 ($P=7.86E-12$) seguido del marcador S13_12290459 ($P=5.66E-10$). Estos dos SNPs representaron la mayor varianza fenotípica (9%) para HCN (Tabla 1).

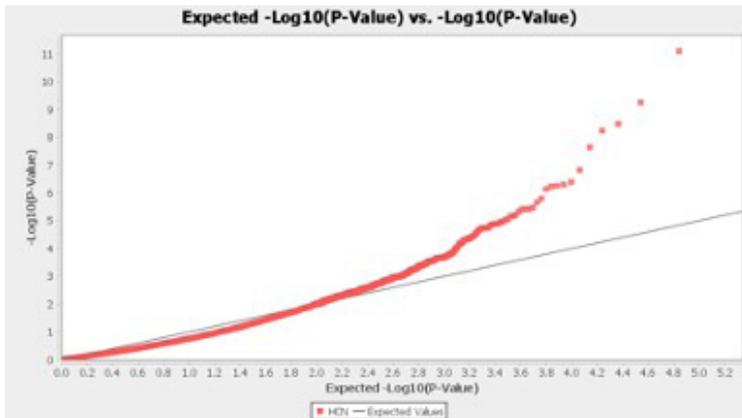


Figura 1. Diagramas de quantile-quantile (QQplot) para el diagnóstico de señales de asociación basadas en las mejores predicciones lineales e imparciales para el contenido total de HCN

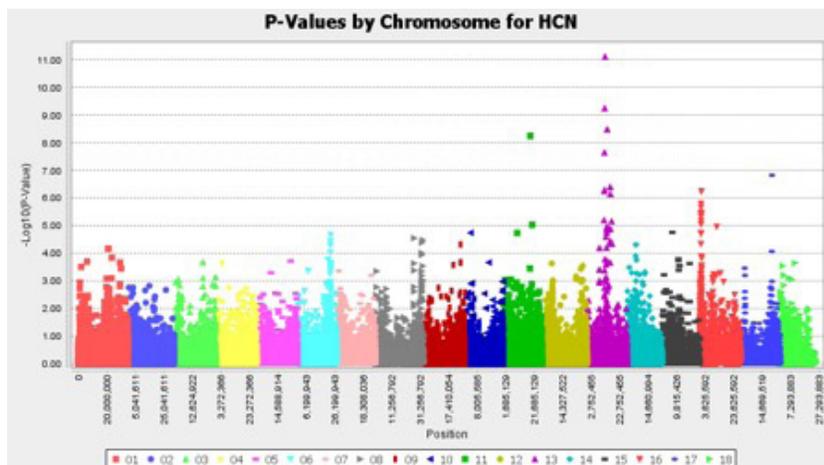


Figura 2. Gráfico de Manhattan para el diagnóstico genómico de las señales de asociación que se basan en las mejores predicciones lineales no sesgadas para el contenido total de HCN

Tabla 1. Lista de SNPs con significado de asociación al genoma de yuca para el contenido de HCN

SNP	Ch ^a	Posición ^b	P (valor)	EA ^d	ED ^c	R ^{2c}	Gen	Anotación del gen ^f
S13_12562917	13	12562917	7.86E-12	-2.26E+02	139.44	0.078	Manes. 13G079400	uncharacterized protein At5g08430
S13_12290459	13	12290459	5.66E-10	-2.31E+02	24.65	0.060	Manes. 13G078400	Eukaryotic aspartyl protease family protein
S13_13997583	13	13997583	3.27E-09	-2.16E+02	-6.88E+01	0.056	Manes. 13G084300	actin-7 [Manihot esculenta (cassava)]
S11_18989037	11	18989037	5.77E-09	310.15	-2.80E+02	0.077	Manes. 11G104200	uncharacterized LOC110625851
S13_12118062	13	12118062	2.27E-08	181.47	50.91997	0.059	Manes. 11G104100	wall-associated receptor kinase 2-like [Manihot esculenta (cassava)]

^a Cromosoma

^b Ubicación del SNP en el cromosoma en la secuencia del genoma de la yuca

^c Proporción de la variación del rasgo genético explicada por los SNP

^d Efecto aditivos

^e Efecto dominante

^f Anotación del gen usando búsqueda en BLAST en Cassava genome HUB

Tabla 2. Descripción de los posibles genes encontrados

Gen	Anotación del gen usando BLAST	Longitud	Locación
Manes.13G079400	Uncharacterized protein At5g08430	15071 bp	[12,568,887 -> 12,585,057] (44.7 centisomes)
Manes.13G078400	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1404 bp / 467 aa	[12,290,137 -> 12,291,540] (43.71 centisomes)
Manes.13G084300	actin-7 [Manihot esculenta]	1392 bp / 463 aa	[13,968,804 -> 13,970,195] (49.68 centisomes)
Manes.11G104200	uncharacterized LOC110625851	502 bp	[18,990,096 -> 18,990,597] (69.39 centisomes)
Manes.11G104100	wall-associated receptor kinase 2 [Manihot esculenta]	3951 bp / 1316 aa	[18,985,862 -> 18,989,812] (69.37 centisomes)

Se hizo referencia a la secuencia del genoma de la yuca en Cassava genoma Hub para identificar genes anotados a una distancia de \pm 0.5 Mb de la región genómica ocupada por los SNP significativos (Tabla 1 y 2). La producción agrícola en todo el mundo está siendo desafiada por un rápido crecimiento de la población humana, tierras cultivables limitadas y cambios climáticos adversos, que requieren mayores esfuerzos para optimizar el uso de los recursos disponibles necesarios para equilibrar el aumento de la producción de alimentos con efectos ambientales reducidos. Por su parte, los mejoradores de plantas podrían beneficiarse de la aplicación de herramientas genómicas avanzadas para descubrir y usar variaciones genéticas funcionales para mejorar los cultivos (Moose & Mumm 2008). Afortunadamente, existen diversos recursos genéticos de yuca en los trópicos para rasgos económicamente importantes (Nassar 2003; Nassar *et al.*, 2007). Dicha variación genética útil podría explorarse a través de GWAS para aislar y mejorar los rasgos de importancia agrícola en un cultivo que ciertamente proporcionará alimento a esta población humana en rápido crecimiento (Ceballos *et al.*, 2015). En consecuencia, este

estudio se centró en el contenido de HCN. Una prueba de GWAS con 69.132 marcadores de SNP y 236 genotipos de yuca se realizó con el fin de comprender las causas genéticas de la variación natural del contenido de HCN en la yuca. Tal conocimiento proporcionaría un marco para emprender una mejora genética más sistemática de este cultivo para disminuir los niveles de contenido de HCN en las raíces y hojas.

La naturaleza heterocigota y el gran tamaño del genoma de la yuca son factores importantes a tener en cuenta al aplicar las tecnologías NGS para estudiar el cultivo (Oliveira *et al.*, 2012; Ceballos *et al.*, 2015). La secuenciación del genoma de la yuca tiene aproximadamente 582.25 Mb de longitud con un total de 33.033 loci que contienen transcripciones codificantes de proteínas dispuestas en 18 cromosomas (Goodstein *et al.*, 2012; Prochnik *et al.*, 2012).

Conclusiones

En conclusión, este estudio fue uno de los esfuerzos pioneros para aplicar las tecnologías NGS para dilucidar la genética de la yuca a nivel molecular y ha demostrado que GWAS es una poderosa herramienta para desentrañar factores genéticos relacionados con variaciones naturales de caracteres importantes en la yuca. El GWAS identificó cuatro SNPs fuertemente vinculados al contenido de HCN en la yuca, ubicado en las cercanías de los genes Manes.13G079400, Manes.13G078400, Manes.13G084300, Manes.11G104200 y Manes.11G104100. Estos SNPs podrían proporcionar una visión refinada de la arquitectura genética del contenido de HCN y ofrecer una base práctica para el desarrollo de variedades de yuca con bajos niveles de HCN. Sin embargo, se requieren esfuerzos adicionales para secuenciar la región genómica que contiene la señal de asociación significativa con el fin de descubrir información de secuencia útil que puede apuntalar las funciones metabólicas de los SNPs asociados con respecto a la acumulación de HCN en raíces de yuca.

Referencias

- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., y Buckler, E.S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19),2633-2635. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm308
- Ceballos, H., Kawuki, R. S., Gracen, V. E., Yencho, G. C., & Hershey, C. H. (2015). Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(9), 1647–1667. <http://doi.org/10.1007/s00122-015-2555-4>
- Collard, B., Jahufer, M., Brouwer, J., and & Pang, E. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Cruz, D., De la Hoz, J., Perea, C., Quintero, J., Duitama, J. (2014). NGSEP (*Next Generation Sequencing Eclipse Plugin*). Software download. <http://sourceforge.net/p/ngsep/wiki/Home/>.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature reviews. Genetics*, 12(7), 499–510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>
- Dellaporta S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983) A Plant DNA Mini-preparation Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Dixon, A., Asiedu, R. and & Bokanga, M. (1994). Breeding of cassava for low cyanogenic potential: problems, progress and prospects. *Acta Horticulturae*, 375, 153-161. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.375.13>
- Elshire, R.J, Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E. & Mitchell, S. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLOS ONE*, 6(5): e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>

- Essers, S. A. J. A., Bosveld, M., van der Grift, R. M., & Voragen, A. G. J. (1993). Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *63*, 287-296. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630305>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, *14*(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Glaubitz, J. C., Casstevens, T. M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R. J., Sun, Q., & Buckler, E. S. (2014). TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS one*, *9*(2), e90346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090346>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, *40*(1), D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Iglesias, C.A, Sánchez ,T., and & Yeoh, H.H. (2002). Cyanogens and Linamarase Activities in Storage Roots of Cassava Plants from Breeding Program. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*(4), 379 - 387. [10.1006 / jfca.2002.1079](https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1079).
- Milne, I., Shaw, P., Stephen, G., Bayer, M., Cardle, L., Thomas, W. T., Flavell, A. J., & Marshall, D. (2010). Flapjack--graphical genotype visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *26*(24), 3133–3134. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq580>.
- Monfreda, C., Ramankutty, N., and & Foley, J. A. (2008), Farming the planet: 2. Geographic distribution of crop areas, yields, physiological types, and net primary production in the year 2000, .Global Biogeochem. *Cycles*, *22*(1), GB1022, doi:10.1029/2007GB002947.
- Moose, S. P., & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, *147*(3), 969-977. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.118232>
- Nassar N. M. (2003). Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and wild relatives. *Genetics and molecular research: GMR*, *2*(4), 334–347.

- Nassar, N., Vizzotto, C. S., Schwartz, C. A., & Pires, O. R., Jr (2007). Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. *Genetics and molecular research: GMR*, 6(1), 116–121..
- Oliveira, E.J., Resende, M.D.V., Silva Santos, V., Ferreira, C.F., Oliveira, G.A.F., Silva, M.S. & Aguilar-Vildoso, C.I. (2012). Genome-wide selection in cassava. *Euphytica*, 187(2:), 263-276. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-012-0722-0>
- Peterson, G., Dong, Y., Horbach, C., & Fu, Y.-B. (2014). Genotyping-By-Sequencing for Plant Genetic Diversity Analysis: A Lab Guide for SNP Genotyping. *Diversity*, 6(4), 665–680. <https://doi.org/10.3390/d6040665>
- Prochnik, S., Reddy Marri, P., Desany, B., Rabinowicz, P., Kodira, C., Mohiuddin, M., Rodríguez, F., Fauquet, C., Tohme, J., Harkins, T., Rokhsar, D. & Rounsley, S. (2012). The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. *Tropical Plant Biology*, 5, 88–94 . <https://doi.org/10.1007/s12042-011-9088-z>
- Salvador, E.M., Steenkamp V., & McCrindle, C.M.E. (2014). Production, consumption and nutritional value of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) in Mozambique: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 6(3), 29-38
- Storey, J.D. (2002). A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64(3), 479-498. <https://doi.org/10.1111/1467-9868.00346>
- Turner, S.D. (2014). QQMAN: An R package for visualizing gwas results using Q-Q and manhattan plots. *BioRxiv*. 005165. <http://biorxiv.org/content/early/2014/05/14/005165>.
- Xinyou, Y., Stam, P., Kropff, J.M., Schapendonk, H.C.M. (2003). Crop modeling, QTL mapping, and their complementary role in plant breeding. *Agronomy Journal*, 95(4), 90–98. doi: 10.2134/agronj2003.0090

THURINCINA H ESTIMULA LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE RAÍZ EN PLÁNTULAS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES NORMALES Y DE SALINIDAD

Julio Armando Massange-Sánchez^{1*}, América Selene Gaona-Mendoza², Luz Edith Casados-Vázquez^{2*}

RESUMEN

El aumento de la productividad del cultivo de maíz demanda el uso indiscriminado de agroquímicos, siendo una práctica no amigable con el ambiente. En lugar de eso, es posible emplear compuestos de origen bacteriano que favorezcan el crecimiento vegetal y/o reduzcan las pérdidas causadas por el ataque de enfermedades e insectos. Thurincina H es un péptido antimicrobiano de 31 aminoácidos con la capacidad de influir en el crecimiento vegetativo de plantas, lo que resulta de gran interés biotecnológico para su aplicación. El objetivo de esta investigación fue generar una cepa de *B. thuringiensis* capaz de producir thurincina H, y evaluar su efecto en la germinación y desarrollo de la raíz en maíz bajo condiciones control y de salinidad. La aplicación tanto de thurincina H en extracto crudo como purificada resultó en un aumento del 7% en el porcentaje de germinación y del 10% en la longitud radicular. Además, se observó un alivio significativo del efecto inhibitorio del crecimiento de las raíces en condiciones de salinidad.

PALABRAS CLAVE

thurincina H, germinación, maíz, salinidad.

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Vegetal, Camino Arenero 1227, El Bajío, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México. * jmassange@ciatej.mx

² Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, km 9 carretera Irapuato-Silao ap. 311 CP, Col. Centro, 36500 Irapuato, México. * edith.casados@ugto.mx

Introducción

Thurincina H es una bacteriocina producida por *B. thuringiensis*. Es un péptido pequeño con masa molecular de 3.1 kDa (Fig. 1A), tiene cuatro puentes tioéter de azufre unidos al α -carbono que estabilizan la estructura (Figura 1B) (H. Lee *et al.*, 2009; Sit *et al.*, 2011). Los componentes genéticos para la producción de thurincina H, se ubican en el cromosoma bacteriano y consisten en un grupo de 10 genes (Figura 1C), que están implicados en la regulación, modificación, procesamiento y autoinmunidad (Abriouel *et al.*, 2011). En medio del grupo de genes se encuentra un promotor divergente que regula río arriba los genes *thnR*, *thnD*, *thnE* y *thnP*. Los genes *thnRDE* forman un pequeño operón que le otorga inmunidad contra la propia bacteriocina (Casados-Vázquez *et al.*, 2018) y *thnP* tiene homología con la serina proteasa EpiP de procesamiento de péptidos líder epidérmico (Lee *et al.*, 2009). Río abajo del promotor divergente se encuentra los genes estructurales *thnA1*, *thnA2* y *thnA3* que codifican para el pre-péptido de thurincina H, seguido se encuentran los genes *thnB*, *thnT* y *thnI*. El gen *thnB* es una proteína SAM radical requerida para la modificación postraducciona, esta enzima es responsable de la formación de enlaces tioéter (Wieckowski *et al.*, 2015). El gen *thnT* actúa como un transportador ABC, se le ha atribuido la función de exportar thurincin H al exterior de la célula (Lee *et al.*, 2009) y, finalmente, el gen *thnI* codifica para un péptido de 95 aminoácidos, del cual se desconoce su participación en el grupo de genes (Casados-Vázquez *et al.*, 2018).

Debido a la importancia económica y cultural del maíz en México, se buscan estrategias para aumentar la productividad del cultivo. Como alternativa a ello, pueden utilizarse compuestos de origen bacteriano con la capacidad de promover el crecimiento vegetal y/o disminuir las pérdidas causadas por el ataque de enfermedades e insectos como *Spodoptera frugiperda* (Kumar *et al.*, 2021; Valtierra-de-Luis *et al.*, 2020). Las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos estructuralmente diversos producidos por bacterias para atacar cepas de bacterias competidoras dentro de su entorno inmediato. Particularmente,

thurincina H tiene el potencial para ser usado como factor/promotor del crecimiento (K. D. Lee *et al.*, 2009). Estudios han demostrado que su aplicación en hojas o raíz estimula el crecimiento en soja y maíz (Gray *et al.*, 2006). También puede ser usado para aliviar la inhibición de la germinación por estrés salino (Subramanian *et al.*, 2016). Este mismo grupo sugiere que las semillas germinadas alteran su proteoma en respuesta a thurincina H y/o estrés salino (Subramanian *et al.*, 2016). En este aspecto, la capacidad de thurincina H para estimular el crecimiento vegetal, hace de esta bacteriocina un candidato potencial para la mejora de cultivos.

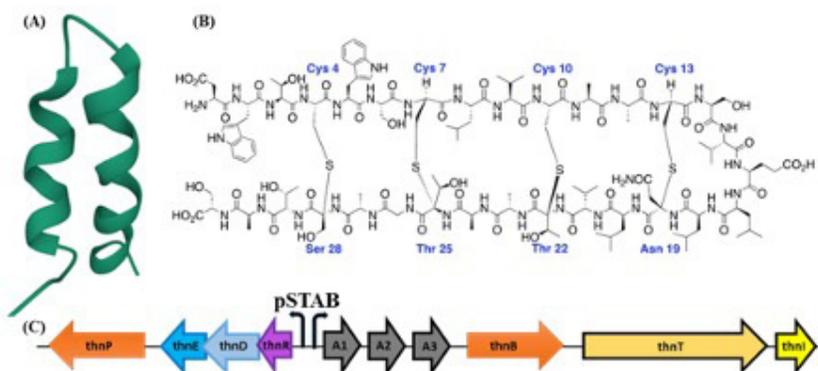


Figura 1. Estructura de la thurincina H y clúster de diez genes requeridos para la regulación, modificación, procesamiento e inmunidad. (A) Estructura peptídica de la thurincina H, (B) enlaces tioéter de azufre unidos al α -carbono, (C) clúster de diez genes necesarios para la producción de thurincina H. pSTAB, promotor de esporulación.

En este trabajo se generó una cepa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 capaz de producir thurincina H en la etapa de esporulación (HD1 pSTAB-Thur). Esta construcción permite a la bacteria producir al mismo tiempo las proteínas Cry y thurincina H. La actividad antimicrobiana de thurincina H fue evaluada para confirmar la presencia y funcionalidad de la misma. Posteriormente, la aplicación de thurincina H sobre las semillas de maíz fue realizada para evaluar su efecto sobre la germinación y crecimiento de la raíz bajo condiciones

Thurincina h estimula la germinación y el crecimiento de raíz en plántulas de maíz...

normales y de salinidad. Este trabajo sienta las bases para la ingeniería de *B. thuringiensis* en función de producir una combinación eficaz de proteínas insecticidas Cry y bacteriocinas.

Metodología

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 y *B. thuringiensis* Cry B, con sus respectivas transformantes, se cultivaron en medio de soya tripticaseína (TSB) o agar de soya tripticaseína (TSA) a 28°C con una agitación de 200 rpm durante 16 horas según fuera conveniente.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad de la bacteriocina se determinó por el método de difusión en pozos. Para ello, se mezclaron 20 mL de agar de pozos (12 g de agar, 1.5 g de TSB en 1 L) con 140 µl de una suspensión de la cepa indicadora (10^8 células/mL). Una vez gelificadas las placas de agar, se realizaron pozos de 7 mm de diámetro donde se adicionaron 90 µl de los extractos crudos dializados tomados a las diferentes horas. Las placas se incubaron durante 16 horas a 4°C para permitir la difusión de las muestras. Finalmente, los cultivos se incubaron a 28°C durante 24 horas y después se midieron los diámetros de las zonas de inhibición y se calculó la actividad específica en relación con el diámetro de inhibición y proteína total.

Purificación de thurincina H por FPLC

Las muestras de thurincina H obtenidas por precipitación con sulfato de amonio fueron sometidas a un segundo paso de purificación por exclusión molecular con la columna Superdex 30 HiLoad 16/600 (GE Healthcare company). Se colectaron fracciones de 1 mL y se les probó actividad por el método de difusión en pozos. De las muestras probadas se guardaron las correspondientes a la fracción 38, aproxi-

madamente en el minuto 297, donde hubo actividad antimicrobiana. Posteriormente, las fracciones con actividad se analizaron mediante dos geles de poliacrilamida al 16% (SDS-PAGE) usando buffer tris-tricina (Schägger, 2006); un gel se tiñó con plata y el otro se analizó mediante el ensayo de actividad por sobrecapa, para lo cual se fijó por 50 min con solución de fijado (20% isopropanol, 10% ácido acético, 70% H₂O), se lavó con agua destilada 6 veces cada 10 min; después del último lavado, se equilibró con buffer de fosfatos 100 mM pH 7 por 10 min, el gel se colocó en una caja petri y se le añadieron 10 mL de agar de pozos con 70 µl de un cultivo de 2 h de la bacteria indicadora (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

Obtención de extractos crudos de Cry⁻B silvestre Cry⁻B/pThur, Cry⁻BΔThnA

El extracto crudo que contiene thurincina H fue producido por la cepa recombinante de Bt Cry⁻B/pThur; se utilizaron como controles negativos los extractos crudos provenientes de la mutante Cry⁻BΔThnA (cepa transformada con clúster genético de la thurincina H sin los genes estructurales ThnA1A2A3 en el vector pHT3101) y de Cry⁻B silvestre. Los extractos se obtuvieron a partir de un cultivo de 200 mL de TSB con o sin antibiótico, dependiendo de la cepa y su construcción, por triplicado. Se incubaron a 28°C y con agitación de 200 rpm por 96 horas (tiempo en que se observó lisis celular). Cada 12 horas se tomaron alícuotas de 25 mL, las cuales se centrifugaron a 6000 rpm por 25 min. En cada toma de muestra, se midió densidad óptica (D.O.600nm) para monitorear el crecimiento de cada cepa. Para probar la actividad antibacteriana los sobrenadantes fueron tratados con sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ al 40% de saturación, se dejaron en agitación durante 16 horas a 28°C, una vez pasado el tiempo, se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos y los botones fueron resuspendidos en buffer de fosfatos pH 7 50 mM (K₂HPO₄, KH₂PO₄), se dializaron durante toda la noche en el mismo buffer. Para la diálisis se utilizó una membrana con corte de 3.5 kDa (Spectra/Por® 3 Dialysis membrane). Los extractos protéicos crudos dializados se cuantificaron mediante Bradford.

Evaluación de la tasa de germinación y crecimiento de la raíz bajo condiciones normales y de salinidad

Para los ensayos de germinación se utilizaron semillas de maíz blanco B-937 (Biosemillas), las cuales se hidrataron 1 hora con agua destilada estéril seguido de tres lavados. Posteriormente, se desinfectaron por inmersión en etanol al 80% durante un minuto y se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril. Posteriormente, se agregó hipoclorito de sodio al 20% por 15 minutos y se lavaron tres veces en condiciones de esterilidad para eliminar la mayor parte de los productos químicos de la certificación de las semillas. Sobre un papel filtro Whatman embebido previamente con 2 mL de cada solución y colocado en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, se colocaron 5 semillas desinfectadas, considerando un total de 100 semillas por tratamiento. Las semillas fueron puestas a germinar en un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad) a 28°C y 76±10% humedad relativa ambiental por un tiempo de 96 horas. Finalmente, se registró el porcentaje de semillas germinadas y la longitud radicular. Se consideró como semilla germinada aquella que presentó desarrollo radicular y emergencia del hipocótilo.

Resultados y discusión

Purificación y actividad antimicrobiana de thurincina H

La producción de thurincina H se realizó con la cepa sobreproductora Cry⁺B/pThur; una vez obtenida, se verificó la actividad antimicrobiana de thurincina H por el método de difusión en pozos y posteriormente se purificó por cromatografía de exclusión molecular. Se recolectaron 70 fracciones, a las cuales se les realizó un ensayo de actividad para encontrar las fracciones con la thurincina H pura, . la La fracción 38 (que se tomó a los 297 min) mostró efecto inhibitorio, en esa fracción se observó un pico único como se muestra en el cromatograma (Figura 2A). Se concentraron 100 µL de esta fracción en un 50% del volumen total y corridas en un gel tris-tricina teñido con plata, en el

cual se detectó una banda de aproximadamente 4 kDa (Figura 2C), la cual corresponde al peso de thurincina H. Al mismo tiempo se realizó actividad en sobrecapa, en donde se muestra el efecto inhibitorio correspondiente a la banda de thurincina H (Figura 2B).

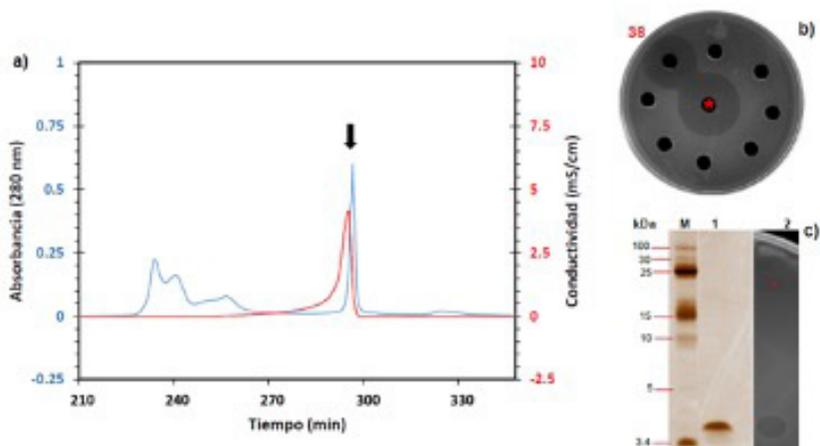


Figura 2. Purificación y actividad antimicrobiana de thurincina H. a) Cromatograma de purificación por cromatografía de exclusión molecular. La flecha negra indica el pico de elución de la actividad antimicrobiana al tiempo ~300 min. b) Actividad antibacteriana por el método de difusión en pozos utilizando *B. cereus* como cepa indicadora. Las fracciones 37 a 44 fueron analizadas para seleccionar aquellas que contenían la thurincina H, siendo ésta la fracción 38. El extracto crudo de la thurincina H fue utilizado como control positivo (marcado con un asterisco). c) Geles tris-tricina. M: marcador de peso molecular; carril 1, thurincina H pura concentrada (Fracción 38) teñida con plata; carril 2, thurincina H pura en sobrecapa utilizando *B. cereus* como cepa indicadora.

Efecto de la thurincina H sobre la tasa de germinación de semillas de maíz B-937

Para analizar el efecto de thurincina H sobre la germinación de semillas de maíz, se utilizó thurincina H purificada a una concentración de 5×10^{-9} mol L⁻¹, y extracto crudo de thurincina H a 80 µg/mL.

Thurincina h estimula la germinación y el crecimiento de raíz en plántulas de maíz...

El porcentaje de germinación se incrementó un 7% cuando se aplicó tanto thurincina H purificada como en extracto crudo (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de germinación de maíz blanco (B-937 BIOSEMILLAS)

Tratamientos	Porcentaje (%) de Germinación
Control agua	85 ± 2.10 ^a
Thur H -Purificada (5 nM)	92 ± 2.10 ^b
Thur H - Extracto crudo (80 µg/mL)	92 ± 2.10 ^b

Valores promedio (n=100) ± Desviación estándar. Literales diferentes entre cada fila indican diferencia significativa (P ≤ 0.05).

Efecto de la thurincina H sobre el crecimiento de la raíz en maíz

La aplicación de thurincina H tanto de manera purificada como en extracto crudo estimula el crecimiento de la raíz. Concretamente, la longitud de la raíz en semillas germinadas incrementó de 5.8 a 6.3 mm a las 96 horas, lo que representa un ~10 % más largas que las semillas que fueron tratadas con agua (Figura 3). Estos resultados indican que la aplicación de thurincina H puede realizarse tanto de manera purificada como en extracto crudo para estimular la tasa de germinación y/o incrementar la longitud de la raíz. No obstante, el uso del extracto crudo facilita la producción y aplicación de la thurincina H, motivo por el cual en nuestro siguiente ensayo usamos el extracto crudo.

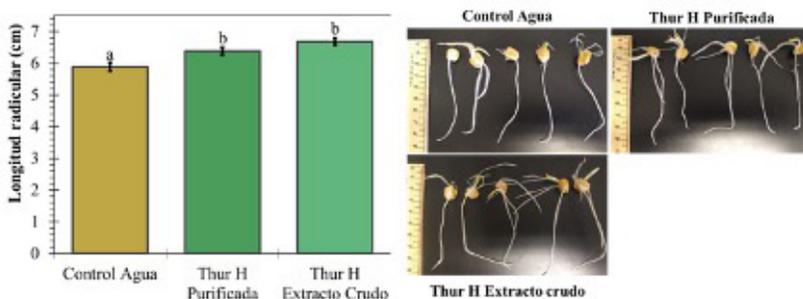


Figura 3. Incremento en la longitud de la raíz de maíz mediante la aplicación de thurincina H. Thur H -Purificada (5 nM), Thur H -Extracto crudo (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todos los datos se obtuvieron de un total de 100 semillas por tratamiento ($n = 5 \times 20 = 100$). Literales diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) por tratamiento

Efecto de la thurincina H sobre el crecimiento de la raíz en maíz bajo condiciones de salinidad

Las semillas de maíz fueron sometidas a un estrés salino de 50 mM NaCl. Posteriormente, se les adicionaron cuatro tratamientos; thurincina H en extracto crudo (EC +), control sin extracto crudo (EC -), extracto crudo de una cepa de *B. thuringiensis* silvestre que no contiene el plásmido de diez genes para producir thurincina H (EC silvestre), extracto crudo de una cepa de *B. thuringiensis* que tiene siete de los diez genes del clúster, pero le faltan los tres genes estructurales de Thurincina H (EC ΔThnA). Las semillas tratadas con EC + mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) en la longitud de la raíz principal en comparación con las que no tenían extracto EC -. La longitud radicular de las semillas tratadas con EC + tuvieron un promedio de ~ 7 cm, mientras que las semillas control sin extracto crudo EC- fue de ~ 6.1 cm. Los tratamientos EC silvestre y EC ΔThnA mostraron un crecimiento radicular de ~ 6.3 cm y ~ 6.5 cm, respectivamente. La aplicación de EC + fue capaz de aliviar la inhibición del crecimiento de la raíz causada por el estrés salino. Sin embargo, no evita la reducción del crecimiento de la raíz por salinidad,

ya que el crecimiento promedio de semillas que fueron solo tratadas con agua fue de ~8.1 cm. Curiosamente, el fondo genético de las cepas de *B. thuringiensis* EC silvestre y EC Δ ThnA también reducen la severidad del estrés salino en comparación con EC -. Esto sugiere que puede haber presencia de moléculas en las cepas que son capaces de inducir un mecanismo de tolerancia en las plántulas.

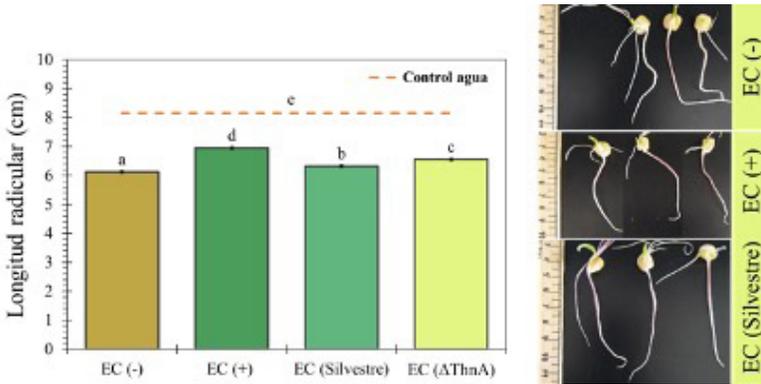


Figura 4. Aplicación de thurincina H disminuye la inhibición del crecimiento de la raíz provocado por estrés salino (50 mM). (EC -) sin extracto crudo, (EC +) extracto crudo aplicado, EC (silvestre) extracto crudo de una cepa de *B. thuringiensis* silvestre sin el plásmido de diez genes que producen thurincina H, EC (Δ ThnA) extracto crudo con el plásmido, pero sin los tres genes estructurales de Thurincina H. Todos los datos se obtuvieron de un total de 100 semillas por tratamiento ($n = 5 \times 20 = 100$). Literales diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) por tratamiento

Las bacteriocinas son proteínas con propiedades bactericidas y bacteriostáticas, dependiendo de su estructura. Particularmente, thurincina H tiene el potencial para actuar como péptido antimicrobiano y promotor del crecimiento (Gray *et al.*, 2006). Estudios previos han demostrado que la aplicación de thurincina H estimula el crecimiento en soya y maíz (H. Lee *et al.*, 2009; K. D. Lee *et al.*, 2009). Aquí radica la importancia de generar una cepa de *B. thuringiensis* capaz de producir proteínas Cry y thurincina H. También se ha observado que la aplicación de thurincina H atenúa la inhibición de la germinación

de semillas de soja provocada por estrés salino (Subramanian *et al.*, 2016). Cuando nosotros aplicamos thurincina H sobre las semillas de maíz observamos un incremento del 7% en la germinación y 10 % en el crecimiento de la raíz comparados con el control, además de aliviar el efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz bajo condiciones de salinidad. Estos resultados sientan las bases para el desarrollo una cepa de *B. thuringiensis* capaz de producir una combinación eficaz de proteínas insecticidas Cry y bacteriocinas.

Conclusión

La aplicación de thurincina H pura en concentraciones nanomolares (5 nM) y en extracto crudo (80 µg/mL) durante la etapa de germinación de maíz blanco aumenta el porcentaje de germinación y longitud radicular en un 7% y un 10%, respectivamente. Además, alivia el efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz ocasionado por estrés salino.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el financiamiento al proyecto PN2016/3664 y al Laboratorio Nacional PlanTECC.

Referencias

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Ben Omar, N., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D. K., & Salcedo-Hernández, R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of Bacillus thuringiensis. *Archives of Microbiology*, 187(2), 117–126. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0178-5>
- Casados-Vázquez, L. E., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2018). Regulator ThnR and the ThnDE ABC transporter pro-

- teins confer autoimmunity to thurincin H in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(12), 2349–2360. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1124-7>
- Gray, E. J., Lee, K. D., Souleimanov, A. M., Di Falco, M. R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T. C., Driscoll, B. T., & Smith, D. L. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 545–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02822.x>
- Kumar, P., Kamle, M., Borah, R., Mahato, D. K., & Sharma, B. (2021). *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00440-3>
- Lee, H., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiology Letters*, 299(2), 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01749.x>
- Lee, K. D., Gray, E. J., Mabood, F., Jung, W.-J., Charles, T., Clark, S. R. D., Ly, A., Souleimanov, A., Zhou, X., & Smith, D. L. (2009). The class II d bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta*, 229(4), 747–755. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0870-6>
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Sit, C. S., van Belkum, M. J., McKay, R. T., Worobo, R. W., & Vederas, J. C. (2011). The 3D Solution Structure of Thurincin H, a Bacteriocin with Four Sulfur to α -Carbon Crosslinks. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(37), 8718–8721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201102527>
- Subramanian, S., Ricci, E., Souleimanov, A., & Smith, D. L. (2016). A Proteomic Approach to Lipo-Chitoooligosaccharide and Thuricin 17 Effects on Soybean Germination Unstressed and Salt Stress. *PLoS One*, 11(8), e0160660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160660>

- Valtierra-de-Luis, D., Villanueva, M., Berry, C., & Caballero, P. (2020). Potential for *Bacillus thuringiensis* and Other Bacterial Toxins as Biological Control Agents to Combat Dipteran Pests of Medical and Agronomic Importance. *Toxins*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/toxins12120773>
- Wieckowski, B. M., Hegemann, J. D., Mielcarek, A., Boss, L., Burghaus, O., & Marahiel, M. A. (2015). The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation. *FEBS Letters*, *589*(15), 1802–1806. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.032>

SEMILLAS SINTÉTICAS: UNA ESTRATEGIA PARA LA CONSERVACIÓN DE LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Luciana Di Sario^{1,2*}, María Fany Zubillaga^{1,2}, Sandra Elizabeth Sharry^{1,3} y Patricia A. Boeri^{1,2}

RESUMEN

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una especie herbácea de gran interés para la industria cervecera, que tradicionalmente se propaga de forma asexual, a través de rizomas o esquejes nodales, dado que sólo se utilizan las inflorescencias femeninas (conos). No obstante, ello constituye una desventaja en términos productivos y de calidad fitosanitaria, debido a que estas prácticas, sostenidas en el tiempo, favorecen la dispersión y acumulación de infecciones virales y fúngicas. En Argentina, el cultivo de lúpulo es escaso y poco diversificado, lo que conlleva a que actualmente, las demandas y necesidades del mercado nacional no se encuentren satisfechas. Al respecto, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, entre las que se encuentra la producción de semillas sintéticas, contribuyen positiva y significativamente en los programas de conservación y multiplicación a gran escala de material vegetal de óptima calidad sanitaria. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes condiciones de conservación de semillas sintéticas de lúpulo de la variedad nacional “Mapuche”, con el fin de contribuir a la estandarización de esta técnica y su posterior implementación en distintas variedades de lúpulo. Para ello, explantes meristemáticos procedentes de material vegetal de campo fueron encapsulados en una solución de alginato de sodio y cloruro de calcio, para la obtención de las semillas sintéticas. Posteriormente, se evaluó la conversión de estas bajo condiciones controladas de luz y temperatura

¹ Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica. * ldisario@unrn.edu.ar

² Centro de Investigación y Transferencia (CIT- Río Negro-CONICET).

³ Laboratorio de investigaciones en madera (LIMAD), Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP.

(16 h luz, $21 \pm 2^\circ\text{C}$), luego de un periodo de almacenamiento a 4°C , durante una, dos y tres semanas en un medio basal de Murashige y Skoog, a la mitad de la concentración original. Para la conversión, este medio fue suplementado con citocininas y giberelinas. Los resultados indicaron que si bien es posible la utilización de semillas sintéticas de *Humulus lupulus* var. *mapuche* a bajas temperaturas (4°C) para establecer programas de conservación *ex situ*, es importante considerar que el periodo de almacenamiento de estas no debe exceder las tres semanas bajo dichas condiciones.

PALABRAS CLAVE

Cultivo de tejidos vegetales, micropropagación *in vitro*, encapsulamiento, meristemas.

Introducción

Lúpulo: características y usos

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una especie herbácea de la familia *Cannabaceae*, anual en su parte aérea y perenne en su parte subterránea, que presenta una vida útil de 12 a 15 años. Habitualmente se cultiva entre las latitudes de 35° y 55° de ambos hemisferios, donde el fotoperíodo en la época estival es mayor respecto a otras regiones geográficas, y las temperaturas oscilan entre 16°C y 18°C , condiciones que favorecen su desarrollo fenológico (Doods, 2017; Nievas *et al.*, 2021). Durante la etapa otoño-invernal sólo prevalecen los rizomas, que son empleados tradicionalmente para la reproducción asexual o agámica. Durante el período primavera-estival se reactiva la fase vegetativa con la aparición de nuevos brotes desde los rizomas que crecen notoriamente hasta alcanzar una altura máxima de hasta 6 metros (30 cm por día), con una rápida aparición hojas (Kneen, 2003; Nievas *et al.*, 2021). Luego, cuando la duración del día comienza a disminuir, se induce la etapa reproductiva y se observan las primeras inflorescencias (Sirrinc, 2010; Hiller, 2019). Al tratarse de una especie dioica, las inflorescencias femeninas y masculinas se disponen en las ramas laterales de diferentes pies.

El interés de este cultivo se concentra en las plantas femeninas debido a que estas producen inflorescencias (conos), ampliamente utilizadas en la industria cervecera, y en menor medida, en la farmacéutica. Los conos se caracterizan por presentar glándulas que producen lupulina, un polvo amarillo resinoso compuesto de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran ácidos amargos, aceites esenciales y taninos, que aportan a diferentes aspectos durante la elaboración de la cerveza y constituyen la principal materia prima para el aporte de sabor y/o amargor en esta bebida (Machado *et al.*, 2019).

Cultivo nacional e internacional

La producción mundial de conos se estima en 129 000 toneladas anuales sobre una superficie total de aproximadamente 60 000 hectáreas, concentradas principalmente en Alemania y Estados Unidos (Machado *et al.*, 2019; Martínez Dodda, 2021). En Argentina, el cultivo se reduce a 189 hectáreas, localizadas principalmente en la Comarca Andina del Paralelo 42, que incluye localidades de las provincias de Río Negro y Chubut. La producción promedio es de 300 toneladas al año; no obstante, esta sólo cubre el 22% de la demanda nacional, lo que conlleva a la necesidad de importar materia prima (conos y pellets) por parte de los consumidores (Cámara de la Industria Cervecera Argentina, 2020; Martínez Dodda, 2021). Esta situación se profundiza frente a una escasa oferta de variedades liberadas, muchas de las cuales han quedado obsoletas frente a las nuevas necesidades del sector, que demanda incorporar otros perfiles organolépticos distintivos, ofrecidos por el mercado internacional. Esta escasa oferta varietal, en cantidad y calidad, constituye una problemática para la industria nacional y latinoamericana. En este sentido, en Argentina, la mayor parte de la superficie productiva corresponde a variedades importadas, que relegan el cultivo de otros materiales de origen nacional, como es el caso de la variedad “Mapuche”, destacada por su alto contenido de aceite total.

Métodos de propagación

La demanda comercial concentrada en las plantas femeninas restringe el empleo de semillas para la reproducción de este cultivo. Por ello, tradicionalmente, el lúpulo se propaga de forma asexual mediante rizomas o esquejes nodales, de manera simple y económica (Fragó *et al.*, 2009; Agehara *et al.*, 2020). No obstante, estas formas de propagación presentan desventajas asociadas a la sanidad de las plantas, ya que la reproducción agámica, sostenida en el tiempo, favorece la dispersión y acumulación de infecciones virales y fúngicas (Agehara *et al.*, 2020). En este contexto, las herramientas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales (CTV) y sus diversas técnicas, desempeñan un papel positivo y significativo en los programas de conservación y multiplicación a gran escala de material vegetal de alta calidad sanitaria.

La propagación *in vitro* de lúpulo es factible y es un aspecto clave como una alternativa a la propagación tradicional. Además de las secciones nodales, existen antecedentes del empleo de otros tipos de explantes como brotes adventicios, pecíolos, secciones internodales, e incluso meristemas, para su regeneración (Fragó *et al.*, 2009). En los últimos años, el cultivo de meristemas se ha convertido en la principal técnica para la multiplicación vía organogénesis, dado que es posible generar plantas completas, inducir la formación de brotes laterales, establecer estrategias de conservación de germoplasma, preservar las características genéticas de la planta madre, y eliminar patógenos de los cultivos, especialmente virus (Echenique *et al.*, 2004; Fragó *et al.*, 2009).

Semillas sintéticas (SS)

Una de las finalidades del cultivo *in vitro* es obtener semillas sintéticas (SS), especialmente cuando se trabaja con material vegetal de alto valor o con el objetivo de conservarlo. Inicialmente, la producción de SS incluía la encapsulación de embriones somáticos; sin embargo, en los últimos años, la técnica se ha extendido a la encapsulación de otros

explantes con capacidad de convertirse en plantas completas, como brotes apicales o axilares, segmentos de raíces y otros derivados del cultivo *in vitro*. Generalmente, los propágulos se encapsulan en gotas de alginato de sodio al 2% que, según las necesidades, puede complementarse con soluciones específicas como antioxidantes o medios nutritivos (Sharma *et al.*, 2013). Esta matriz que recubre el explante actúa como un endosperma sintético, protege los micropropágulos, proporciona resistencia a la desecación y ejerce la presión mecánica necesaria para retenerlos dentro de la cápsula durante el almacenamiento, lo que facilita la conservación, el transporte, el intercambio de germoplasma, y la mecanización del proceso (Navarro Ureña, 2002; West *et al.*, 2006; Alatar y Faisal, 2012). Asimismo, el éxito de esta tecnología depende de otras variables como las condiciones ambientales durante el almacenamiento; por lo general, se utilizan temperaturas cercanas a los 4°C para cultivos de clima templado, y entre 10 y 15°C para aquellos de clima tropical (Keller *et al.*, 2006; Ray y Bhattacharya, 2008).

Metodología

Material vegetal

Durante el período estival, en la ciudad de Viedma, Río Negro, Argentina, se recolectaron secciones caulinares de lúpulo, de al menos 4 nudos, de la variedad “Mapuche”. Para la desinfección, estas se cortaron en secciones uninodales de aproximadamente 5 cm de longitud, y luego se sumergieron en una solución de etanol 70% v/v durante 5 minutos, en agitación constante. Luego, el material se colocó en una solución de hipoclorito de sodio comercial (35 gCl/l) al 10% v/v, con Tween 20®, por un periodo de 20 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Una vez desinfectado el material, se seleccionaron, bajo lupa binocular y en condiciones de esterilidad, los explantes iniciales que consistieron en secciones meristemáticas con al menos dos primordios foliares.

Obtención de semillas sintéticas

Los explantes meristemáticos, fueron encapsulados en una matriz de alginato de sodio al 2% (p/v), previamente esterilizada, y recogidos en gotas con una micropipeta. Posteriormente, se dispusieron por un periodo de 3 a 5 minutos, en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 100 mM, en agitación constante. Finalmente, las SS obtenidas fueron colocadas sobre papel tissue estéril para eliminar el exceso de CaCl_2 . A fin de evaluar la respuesta a la conservación a corto plazo de los explantes meristemáticos encapsulados, se realizaron tres tratamientos, cada uno de los cuales constó de tres repeticiones de 10 SS ($n=10$). En este sentido, se analizó la respuesta de las SS luego de una, dos y tres semanas de almacenamiento a 4°C en oscuridad (TA, TB y TC, respectivamente), previo a su cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura (16 hs luz, $21 \pm 2^\circ\text{C}$). Asimismo, se realizó un control (T0) para cada tratamiento, que consistió en la incubación de las SS a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad (1, 2 y 3 semanas). El medio de cultivo utilizado durante el almacenamiento en frío fue el de Murashige y Skoog (1962), a la mitad de la concentración original. Mientras que para la conversión de las SS se empleó el mismo medio basal suplementado con BAP (6-bencilaminopurina) 0,0002 g/L, y AG3 (ácido giberélico) 0,001 g/L. Luego de 7, 14 y 21 días, se observó la formación de raíces y el porcentaje de conversión de las SS, es decir, cuando éstas estas produjeron la ruptura de la matriz de encapsulamiento por la aparición de brotes (Ray & Bhattacharya, 2008).

Resultados y discusión

Desinfección

El protocolo de desinfección adoptado en este trabajo para el posterior aislamiento de los meristemas fue exitoso, dado que el 100% de los explantes resultaron libres de contaminación, respuesta que pudo verse favorecida por las características axénicas propias del tejido meristemático. En contraposición a los resultados aquí obtenidos,

Svoboda (1992) registró sólo un 5,2% de explantes meristemáticos libres de contaminación en el cultivo *in vitro* de lúpulo. Esta diferencia, en parte, puede deberse al protocolo de desinfección utilizado por este autor, dado que sólo incluyó un tratamiento con etanol y luego con hipoclorito de sodio en bajas concentraciones y tiempos reducidos.

Obtención de semillas sintéticas

Las SS obtenidas fueron capaces de germinar y convertirse en una planta completa bajo condiciones adecuadas, incluso luego de un periodo de almacenamiento a 4°C (Figura 1). Como se observa en la Figura 2, los tratamientos TA y TB produjeron un 90% de conversión, mientras que TC y el control en oscuridad (T0 osc) obtuvieron porcentajes significativamente menores (20% y 63%, respectivamente). El bajo porcentaje de conversión alcanzado, cuando las SS fueron almacenadas durante 3 semanas a 4°C (TC), indica que estas temperaturas en forma prolongadas pueden afectar la viabilidad de los explantes, conforme a lo señalado por Engelmann (1991). Por otra parte, estudios realizados por diversos autores han demostrado avances significativos en la producción de SS de este cultivo. Así, Martínez *et al.* (1999) lograron establecer un procedimiento para la crioconservación de la variedad “Nugget”, mediante la técnica de encapsulación/deshidratación de ápices obtenidos del cultivo *in vitro*. La tasa de supervivencia informada por estos autores fue del 95-100%, valores similares a los obtenidos en este estudio, en los tratamientos TA y TB, a pesar de las diferencias en el método de conservación y tipo de cápsula empleada. Por su parte, Liberatore *et al.* (2020), encapsularon microestacas de lúpulo del genotipo “Gianni” derivadas del cultivo *in vitro*, en una matriz suplementada con sacarosa y reguladores de crecimiento e informaron una alta viabilidad de todos los explantes encapsulados (100%). Cabe destacar que, en el presente trabajo con la variedad “Mapuche”, se obtuvieron valores de conversión similares a los informados en la bibliografía por los autores anteriormente referenciados, y ello se logró con metodologías más simples y económicas, como el encapsulamiento en alginato de

sodio al 2% (p/v), sin el agregado de otros compuestos en la matriz. Adicionalmente, sólo en el tratamiento en frío durante dos semanas (TB) se logró el enraizamiento exitoso de los brotes que emergieron de las SS, aún en ausencia de auxinas en el medio donde fueron cultivadas. En este caso, la formación de raíces fue del 10% y éstas se produjeron vía organogénesis directa (Figura 1E), es decir, sin la presencia de callo, resultado similar al observado por Martínez *et al.* (1999) en la variedad “Nugget”.

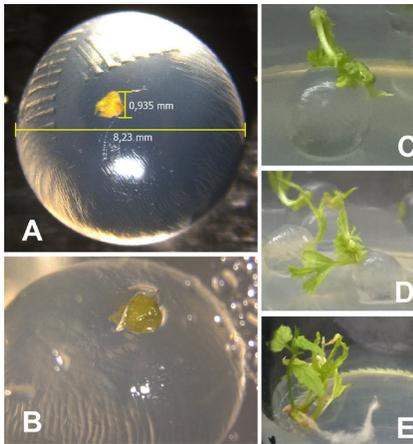


Figura 1. Semillas sintéticas de lúpulo var. “Mapuche”. A: dimensiones; B: rotura de la matriz por el explante; C: elongación del explante; D: elongación del explante; E: enraizamiento

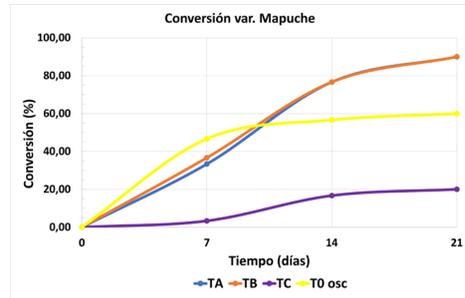


Figura 2. Porcentaje de conversión de semillas sintéticas en el tiempo

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que es posible aplicar la técnica de semillas sintéticas para el establecimiento de protocolos de propagación y conservación de lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. *mapuche*), de manera eficiente y relativamente sencilla. No obstante, bajo las condiciones evaluadas, el almacenamiento en frío, a 4°C, no debe

superar las tres semanas, a fin de evitar daños en los tejidos, y afectar la conversión de las SS.

Por otra parte, se considera que la optimización de la técnica de SS generará un impacto positivo tanto en términos de conservación ex situ de esta especie, como en la mejora del transporte de material vegetal entre las regiones productoras, lo que permitiría la expansión del cultivo. Asimismo, las SS obtenidas a partir de meristemas podrían sustituir satisfactoriamente la propagación asexual por rizomas, y garantizar, de esta manera, la sanidad del material vegetal, particularmente en la variedad “Mapuche”, destacada por su empleo en el sector cervecero artesanal e incluso en cervezas premium.

Finalmente, cabe destacar que este trabajo constituye el primer reporte sobre la obtención de SS de la variedad de lúpulo “Mapuche”, de origen argentino. Asimismo, los resultados aquí obtenidos podrían generar oportunidades para incrementar la producción de este cultivo, lo cual influiría positivamente en la industria cervecera y a la investigación agrícola.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica (Viedma), a Cervecería y Maltería Quilmes, y a la Asociación Civil de Cervecerías Artesanales de Viedma.

Referencias

- Agehara, S., Acosta-Rangel, A., Gallardo, M., y & Vallad, G. (2020). Selection and Preparation of Planting Material for Successful Hop Production in Florida. *EDIS*, 2020(5). <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/HS1381>
- Alatar, A. A., y & Faisal, M. (2012). Encapsulation of Rauvolfia tetraphylla microshoots as artificial seeds and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1367-1374. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.1632>

- Cámara de la Industria Cervecera Argentina. (2020). *Agroindustria cervecera. Análisis de cadena de valor. FIEL – ABECEB*. <http://www.cervecerosargentinos.org/quienes-somos>
- Dodds, K. (2017). *Hops a guide for new growers. Development Officer – Temperate Fruits NSW*. Department of Primary industries. Australian Government. https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0007/712717/hops-guide-fornew-growers.pdf
- Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L., Levitus, G., & Hopp, E. (2004). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Ediciones INTA.
- Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica*, 57, 227-243. <https://doi.org/10.1007/BF00039669>
- Faragó, J., Psenáková, I., & Faragová, N. (2009). The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. *Nova Biotechnologica*, 9(3), 279–293. <http://dx.doi.org/10.36547/nbc.1137>
- Hiller, S., Gingrich, G., & Haunold, A. (2019). *Growing Hops at Home. Cornell Cooperative Extension. Madison County*. <http://madisoncountycce.org/agriculture/hops-program/growing-hops-at-home>
- Keller, E. J., Senula, A., Leunufna, S., & Grübe, M. (2006). Slow growth storage and cryopreservation tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*, 29(3), 411-417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2005.07.012>
- Kneen, R. (2003). *Small Scale and Organic Hops Production. Left Fields, British Columbia*. <http://cesonoma.ucanr.edu/files/238645.pdf>
- Liberatore, C. M., Rodolfi, M., Beghè, D., Fabbri, A., Ganino, T., y & Chiancone, B. (2020). Adventitious shoot organogenesis and encapsulation technology in hop (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109416>
- Machado, J. C., Faria, M. A., y & Ferreira, I. M. (2019). Hops: New Perspectives for an Old Beer Ingredient. En A. Mihai Grumezescu & A. M. Holban (eds.) *Natural Beverages* (pp. 267-301). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816689-5.00010-9>
- Martínez Dodda, J. (2021, 4 de abril). El lúpulo, el motorcito que pone a El Bolsón en la mira del mundo. *Clarín Rural*. Consultado el

- 30 de septiembre de 2021. https://www.clarin.com/rural/lupulo-motorcito-pone-bolson-mira-mundo_0_B4XPkWCoM.html
- Martínez, D., Tamés, R. S., & Revilla, M. A. (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports*, 19(1), 59–63. <https://doi.org/10.1007/s002990050710>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Navarro-Ureña, J. A. (2002). *Encapsulamiento de meristemas de papa (Solanum tuberosum) para la crioconservación y la propagación en invernadero* [informe de bachillerato, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/171/Práctica%20de%20especialidad%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Nievas, W. E., Villarreal, P., Rosati, A., Rodríguez, A. B., & Lago, J. (2021). *El cultivo del lúpulo. Aspectos agroambientales y económicos para el Alto Valle del río Negro*. Ediciones INTA.
- Ray, A., & Bhattacharya, S. (2008). Regeneration of genetically uniform *Boerhaavia diffusa* by culture of nodal explants and synthetic seeds. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2(2), 123-127. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GS-BOOnline/images/0812/IJPDB_2\(2\)/IJPDB_2\(2\)123-127o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GS-BOOnline/images/0812/IJPDB_2(2)/IJPDB_2(2)123-127o.pdf)
- Sharma, S., Shahzad, A., & da Silva, J. A. T. (2013). Synseed technology—a complete synthesis. *Biotechnology Advances*, 31(2), 186-207. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.007>
- Sirrinc, R., Rothwell, N., Goldy, R., Marquie, S. & Brown-Rytlewski, D. (2010). *Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region*. MSU. Michigan State University Extension. *Extension Bulletin E-3083*. <https://www.uvm.edu/sites/default/files/media/Sirrinc-Sustainable-Hop-Production-in-the-Great-Lakes-Region.pdf>
- Svoboda, P. (1992). Cultivation of isolated hop tips (*Humulus lupulus* L.) *in vitro*. *Rostlinná Výroba. Plant soil and environment*, 38(6), 523-528 <https://www.researchgate.net/publication/266396281>

West, T. P., Ravindra, M. B., & Preece, J. E. (2006). Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(3), 223-231. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-006-9155-6>

ESTUDIO DESCRIPTIVO DE TRES VARIEDADES DE *MUSA* SPP. CULTIVADAS EN EL MUNICIPIO DE ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MÉXICO

Héctor Guillén Andrade¹, Judith Cárdenas Peña¹, Elizabeth Martínez¹ y Ana Karen Escalera Ordaz*

RESUMEN

Los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) ejercen un papel muy importante en la seguridad alimentaria y en el desarrollo económico mundial. La conservación y preservación de estos recursos es responsabilidad social. Para su conservación existen dos categorías: conservación *in situ* y *ex situ*. La primera de ellas consiste en la preservación de especies en los sistemas ecológicos y culturales. La conservación *ex situ* mantiene las especies fuera de sus ambientes naturales, comprenden el almacenamiento de semillas, bancos de genes en campo, colecciones *in vitro* y jardines botánicos. En el presente trabajo de investigación se planteó la caracterización de tres variedades de *Musa* spp., las cuales se conocen localmente como: Verde Maduro, Morado y Costillón Cenizo, todas cultivadas en el municipio del Ziracuaretiro, Michoacán, México. La caracterización de 28 caracteres cualitativos y 19 cuantitativos se hizo de acuerdo con los descriptores para el banano (*Musa* spp.) de IPGRI (1996). Los resultados mostraron que las tres variedades presentan características distintivas que permiten su fácil identificación; sin embargo, las variedades con mayor similitud entre ellas fueron Morado y Verde Maduro.

PALABRAS CLAVE

Recursos fitogenéticos, caracterización, banano.

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología. Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín S/N, Emiliano Zapata, 60170 Uruapan, Michoacán. México. Teléfono: (452)5236474. *ana.karen.escalera.ordaz@gmail.com

Introducción

El origen geográfico del plátano fue en la parte sudeste de Asia, de ahí se distribuyó a la India y África. En 1516 los europeos lo introdujeron en América y las Antillas (IICA, 1983). La distribución de los plátanos en México se dio después de que el obispo Vasco de Quiroga, plantara las primeras cinco plantas diferentes de plátano provenientes de las islas Antillas en Ziracuaretiro, Michoacán, eligiendo este lugar por la similitud de las condiciones climáticas con la isla de Santo Domingo (Moreno, 1766). El plátano es un producto de gran importancia económica y forma parte de la seguridad alimentaria de la mayoría de la población, este fruto se comercializa en fresco y, en menor escala, procesado (MIFIC, 2007).

Los recursos fitogenéticos se obtienen de la naturaleza, son limitados y proporcionan la materia prima y los genes con los cuales los genetistas pueden originar mejoras en las variedades de plantas. En los últimos años se ha acelerado la erosión genética, tanto a especies cultivadas como silvestres de uso agrícola debido a la aparición de nuevas tecnologías, la sustitución de variedades locales por introducidas y por los cambios en las técnicas de cultivos; entre otras causas (Esquinas 1982). El material genético es de suma importancia ya que permite que exista variabilidad en los seres vivos, lo cual permite la adaptación a diferentes condiciones ambientales; además de la resistencia a plagas y enfermedades (Berretta & Rivas, 2001). La caracterización de recursos fitogenéticos es un paso fundamental para su conservación y aprovechamiento, bajo esta premisa, se desarrolló este trabajo de investigación con el propósito de conocer de manera técnica las características morfológicas de las variedades conocidas en la región como Morado, Verde Maduro y Costillón Cenizo, que se cultivan en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México.

Metodología

Ubicación geográfica del área de estudio

El municipio de Ziracuaretiro se localiza en el estado de Michoacán, México, entre los paralelos 19° 21' y 19° 31' de latitud norte;

los meridianos 101° 48' y 102° 00' de longitud oeste; altitud entre 1 200 y 2 400 msnm, colinda al norte con los municipios de Uruapan y Tingambato; al este con los municipios de Tingambato, Salvador Escalante y Taretan; al sur con los municipios de Taretan y Uruapan y; al oeste con el municipio de Uruapan (INEGI, 2009).

Localización, identificación y recolecta de frutos de *Musa* spp.

Para identificar las plantas, se hicieron recorridos de campo en las localidades El Copal, La Ciénega y El Papayo de Ziracuaretiro, Michoacán, México, en estos sitios se identificaron frutos de *Musa* spp. de las variedades conocidas localmente como: Costillón Cenizo, Morado y Verde Maduro. Las plantas madre de estas variedades fueron ubicadas mediante un geoposicionador satelital. Los racimos fueron colectados cuando alcanzaron su madurez fisiológica, se identificaron con una abreviatura de acuerdo con el nombre local, después de ser cortados se trasladaron al laboratorio de Recursos Fitogenéticos de la Unidad de Investigación Avanzadas en Agrobiotecnología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

Descripción de las variables evaluadas

La caracterización morfológica del fruto se llevó a cabo con base al descriptor morfológico para el banano (*Musa* spp.), propuesto por el IPGRI-INIBAP/CIRAD (1996). Este descriptor se divide en cuatro categorías (pasaporte, manejo, sitio y caracterización). La categoría de caracterización provee ocho secciones con sus respectivos caracteres a evaluar: apariencia general de la planta (2), pseudotallo/hijos (11), hoja (23), inflorescencia/ yema masculina (16), brácteas (14), flores masculinas y fruto; 25 caracteres, respectivamente. En este trabajo fueron evaluados un total de 47 caracteres distribuidos en cinco categorías: planta (2), hoja (12), inflorescencia (10), brácteas (7) y fruto (16) en las tres variedades analizadas y con base en los descriptores propuestos para *Musa* spp., por el IPGRI (1996).

Análisis de información

Los valores obtenidos se utilizaron para construir dos matrices de datos. La primera se elaboró con los datos cuantitativos, la cual se utilizó para practicar el análisis de varianza en una vía con el procedimiento PROC ANOVA en el cual se presentan los estadísticos simples, asimismo se hizo una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$). La segunda matriz se construyó con todos los valores obtenidos de cada una de las variables cuantitativas y cualitativas, con la cual se practicó un análisis de correlación de Pearson y Filon (1898) mediante el procedimiento PROC CORR en el cual se determinó la relación entre las variables evaluadas, finalmente, se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA para determinar la similitud entre las variables evaluadas.

Resultados y discusión

Variedad Morado. Presenta un hábito foliar normal, la altura del pseudotallo de 400 cm. La tercera hoja presenta las siguientes características: márgenes del pecíolo abiertos erectos, color rosado a malva rojo y un promedio de 1.83 cm. La lámina foliar tiene una longitud promedio de 261 cm y un ancho de 73 cm; por lo tanto, le corresponde una porción de hoja de 3.60 cm, un color verde medio para la cara superior, es cerosa y un color verde medio para la cara inferior y brillante. El pecíolo tiene una longitud de 75 cm. La nervadura en el envés presenta un color no descrito que va un rosado malva con amarillo. El pedúnculo presenta promedios de 72.5 cm para longitud, 5.1 cm de diámetro, 2 nódulos vacíos; el color varía de morado a verde y es muy pubescente/pelos cortos. El racimo tiene una apariencia compacta con un peso promedio de 11 kg, 5 manos/racimo y un peso de 1.65 kg por mano. La inflorescencia es normal en forma de trompo, con diámetro promedio de 8.29 cm y 19.75 cm de longitud. Las brácteas tienen hombros pequeños en la forma de la base, son ligeramente puntiagudas en el ápice y no tiene tinte amarillo en él. En la cara externa presenta color morado y en la interna rosado malva.

El levantamiento de las brácteas es dos o más a la vez y presentan muy poca cera. Los frutos presentan una posición paralela al raquis, un promedio de 15 dedos por mano, con una longitud de 12.5 cm por fruta, ápice truncado, sin vestigios florales, con una longitud de pedicelo de 1.4 cm y ancho de 1.3 cm. Los frutos en estado inmaduro poseen un color de cáscara verde y rosado, rojo o morado; en cambio, cuando están maduros su color es anaranjado rojo, rojo, o rosado/rosado-malva, la cáscara posee un espesor de 0.3 cm, una adherencia de cáscara difícil de desprender y sin grietas. El sabor de esta variedad es dulce y ácido, parecida a la manzana.

Variedad Verde Maduro. La planta tiene un hábito foliar erecto, la altura del pseudotallo tiene un promedio de 400 cm. La tercera hoja presenta márgenes del pecíolo abiertos erectos con un color verde y promedio de 2 cm. La lámina foliar tiene una longitud de 263 cm y un ancho de 79 cm; por lo tanto, le corresponde una porción de hoja de 3.23 cm, un color verde claro, es cerosa y un color verde amarillo para la cara inferior con aspecto opaco. El pecíolo presenta longitud promedio de 83.17 cm. La nervadura en el envés presenta un color verde claro. El pedúnculo presenta promedios de 59 cm para longitud, 5.3 cm de diámetro, un nódulo vacío, color verde claro y es muy pubescente/pelos cortos. El racimo tiene una apariencia muy compacta, con un peso promedio de 18 kg, 6 manos/racimo y un peso de 2.54 kg por cada mano. La inflorescencia es normal en forma de trompo, con promedio de 7.63 cm para el diámetro y 17.66 cm para longitud. Las brácteas tienen hombros pequeños en la forma de la base, son ligeramente puntiagudas en el ápice y no tiene tinte amarillo en él. En la cara externa presenta color morado y en la interna violeta café. El levantamiento de las brácteas una a la vez y son cerosas. Los frutos presentan una posición curvos hacia el raquis, un promedio de 15 dedos por mano, con una longitud de 13.33 cm por fruto, con ápice truncado, sin vestigios florales, con una longitud de pedicelo de 1.32 cm y ancho de 1.42 cm. Los frutos en estado inmaduro poseen un color verde claro al igual que en su estado de maduración, la cáscara posee un espesor de 0.4 cm, una adherencia fácil de desprender y sin grietas. El sabor de esta variedad es ácido.

Variedad Costillón Cenizo. La planta presenta un hábito foliar decumbente, la altura del pseudotallo tiene un promedio de 350 cm. La tercera hoja presenta: márgenes del pecíolo retorcidos hacia el interior, con un color verde y promedio de 2 cm. La lámina foliar tiene un promedio de longitud de 206.3 cm y un ancho de 54.3 cm; por lo tanto, le corresponde una porción de hoja de 4.11 cm, un color verde medio para la cara superior, es cerosa y un color verde medio para la cara inferior y opaca. El pecíolo tiene un promedio en su longitud de 74 cm. La nervadura en el envés presenta un color verde claro. El pedúnculo presentó promedios de 89 cm para longitud, 3.99 cm de diámetro, 3 nódulos vacíos, glabro. El racimo tiene una apariencia compacta con un peso promedio de 8 kg, 5 manos/racimo y un peso de 1.29 kg por cada mano. La inflorescencia es degenerada antes de la madurez en forma lanceolada, con promedio de 10.08 cm para el diámetro y 22.66 cm para longitud. Las brácteas tienen hombros grandes en la forma de la base, son ligeramente puntiagudas en el ápice y tienen tinte amarillo. En la cara externa presenta color azul y en la interna rosada malva. El levantamiento de las brácteas es dos o más a la vez y son cerosas. Los frutos presentan una posición paralela al raquis, un promedio de 10 dedos por mano, con una longitud de 12.5 cm por fruto, con ápice puntiagudo, base del estilo prominente, con una longitud de pedicelo de 2.45 cm y ancho de 1.18 cm. Los frutos en estado inmaduro presentan un color de cáscara verde azul a blanquecino,; en cambio, cuando están maduros su color es amarillo blanquecino. La cáscara posee un espesor de 0.3 cm, una adherencia de cáscara difícil de desprender y sin grietas. El sabor de esta variedad es dulce y ácida, como el de la manzana. En las Figura 1 y 2, se presentan fotografías que muestran las principales características distintivas de las tres variedades analizadas.

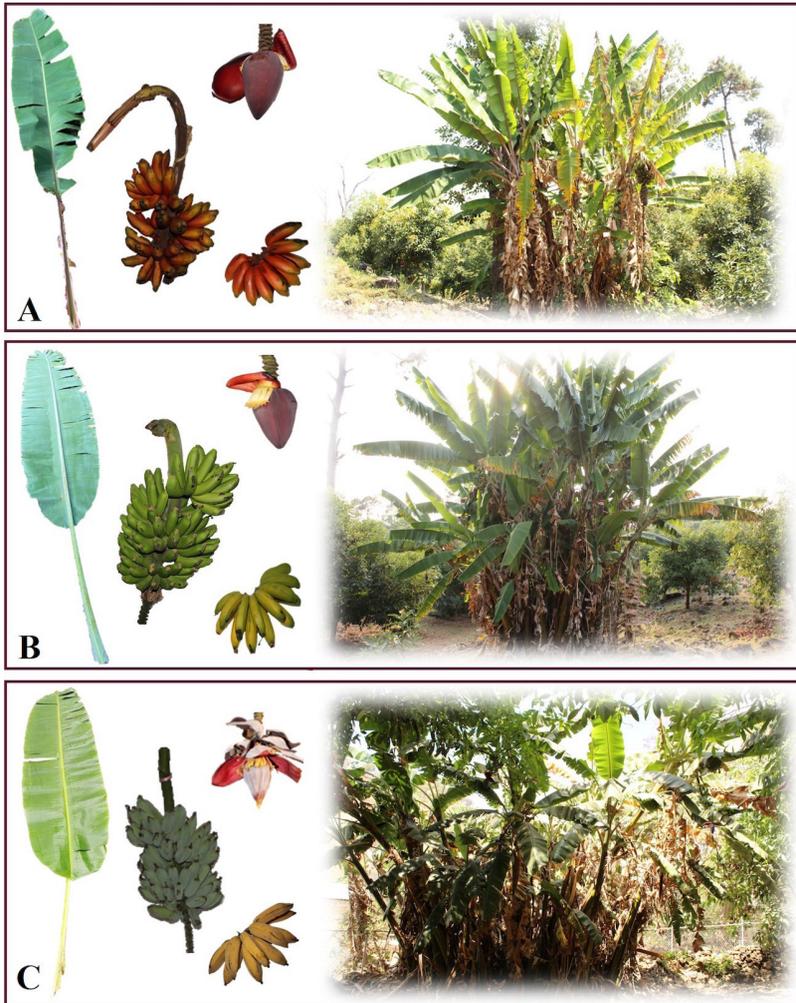


Figura 1. Fotografías que muestran las características distintivas de las variedades de *Musa*, evaluadas y cultivadas en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México: variedad Morado (A), variedad Verde Maduro (B) y Costillón Cenizo (C)

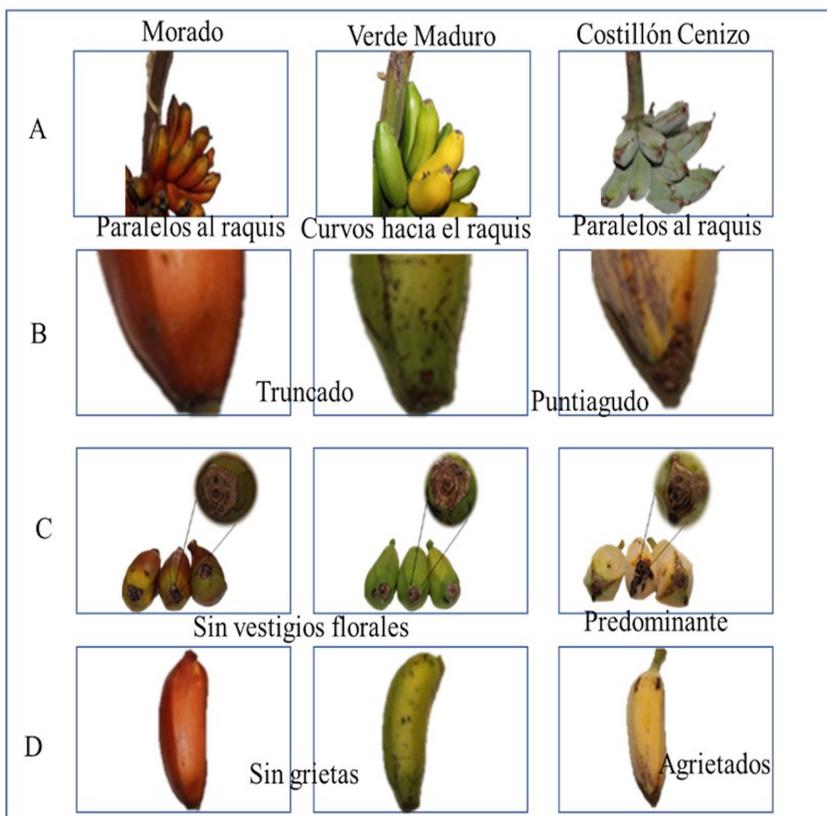


Figura 2. Características morfológicas evaluadas en tres variedades cultivadas de *Musa* spp., procedentes de Ziracuaretiro, Michoacán, México: A) posición de los frutos, B) ápice del fruto, C) vestigios florales y D) grietas en la cáscara

Asociación entre características cualitativas y cuantitativas

Para determinar las asociaciones entre los caracteres evaluados, se hizo un análisis de correlación múltiple (Pearson & Filón, 1898) para las variables analizadas. Las correlaciones significativas de los caracteres analizados con valores que oscilan entre $r = 0.80$ a 1 fueron un total de 27. En la Tabla 1, se presentan las correlaciones positivas más significativas determinadas en la evaluación de las tres variedades estudiadas.

De acuerdo al trabajo realizado por Gonzáles *et al.* (2009), en el cual se caracterizaron 34 genotipos de plátanos pertenecientes al genofondo cubano de *Musa spp.*, y cinco obtenidos por diferentes métodos de mejora, se evaluaron 50 caracteres morfológicos, de los cuales se determinaron las variables morfoagronómicas más importantes en donde destacan: enanismo, color del pseudotallo, manchas en la base del pecíolo, color de las manchas, posición del raquis, tipo de yema masculina, forma de la yema masculina, forma del ápice de la bráctea, imbricación de las brácteas, pigmentación tépalo compuesto, color lobos tépalo compuesto, aspecto tépalo libre, color del estigma, color del ovario, forma de los frutos, sección transversal del fruto.

Tabla 1. Relación de características morfológicas altamente correlacionadas evaluadas en tres variedades de *Musa spp.*, en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México

Características	Valor de r	Características	Valor de r
Ancho del pedicelo del fruto/color de la cáscara inferior de la lámina	1	Peso del racimo/peso de las manos	0.97223
Ancho del pedicelo del fruto/aspecto de la cara inferior de la lámina	1	Hábito foliar/tipo de yema masculina	0.86603
Ancho del pedicelo del fruto/presencia de cera en la lámina	1	Hábito foliar/levantamiento de las brácteas	0.86303
Color de los márgenes del pecíolo/color de la cáscara inferior de la lámina	1	Canal del peciolo en la hoja III/tipo de yema masculina	0.83744
Tipo de yema masculina/vestigios florales	1	Canal del peciolo en la hoja III/forma de la yema masculina	0.94491
Color de los márgenes del pecíolo/color de la nervadura en el envés	1	Canal del peciolo en la hoja III/vestigios florales	0.94491
Color de la nervadura en el envés/adherencia la cáscara	1	Canal del peciolo en la hoja III/color de la cáscara inmadura	0.94491
Tipo de yema masculina/vestigios florales	1	Canal del peciolo en la hoja II/grietas en la cáscara	0.91725
Tipo de yema masculina/grietas en la cáscara	1	Presencia de cera en las láminas/color de la nervadura en el envés	0.94491
Forma de la yema masculina/grietas en la cáscara	1	Presencia de cera en las láminas/adherencia de la cáscara	0.91468

Estos estudios permiten observar diferentes caracteres con alto valor de correlación que posteriormente en futuros trabajos reducen el número de caracteres a evaluar.

Conclusiones

Las tres variedades de *Musa* spp. estudiadas poseen características distintivas que permiten su fácil identificación. Las variedades Morado y Verde Maduro presentaron la mayor similitud morfológica entre ellas. El peso de racimo y el número de nódulos vacíos en el pedúnculo fueron las características con el mayor.

Referencias

- Berretta, A., & Rivas, M. (2001). *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura- IICA.
- Esquinas, A. J. T. (1982). *Los recursos fitogenéticos una inversión segura para el futuro*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.
- González D. I., Ramírez P. T., Rodríguez M. S., Román M. I., Hernández E. M., Beovides González Díaz, L., Ramírez Pedraza, T., Rodríguez Morales, S., Román, M., Hernández Estrada, M., Beovides García, Y., Gálvez Guerra, J. R. & Álvarez, E. (2009). Características morfo-agronómicas de genotipos de plátanos (*Musa* spp.) pertenecientes al banco de Germoplasma del INIVIT. *Centro Agrícola*, 36(2), 31-39. ISSN on line: 2072-2001
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (1983). *El plátano. Estación experimental El Recreo*. Midiní'a DGTA.
- Hoyos-Leyva, J. D., Jaramillo-Jiménez, P. A., Giraldo-Toro, A., Dufour, D., Sánchez, T. y Lucas- Aguirre, J. A. (2012). Caracterización física, morfológica y evaluación de las curvas de emplastamiento de musáceas (*Musa* spp). Universidad la Gran Colombia. *Acta Agronómica*, 61(3), 214-229.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Ziracua-*

- retiro, Michoacán de Ocampo Clave geoestadística16111*. Consultado el 10 de enero de 2020. http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/16/16111.pdf.
9. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos/International Network for the Improvement of Banana and Plantain/Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agrícola para el Desarrollo. (1996). *Descriptor para el banano (Musa spp.)*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Red Internacional para el Mejoramiento de1 Banano y el Platano, Montpellier, Francis; y el Centre de cooperation agronomique pour le developement, Montpellier, Francis. ISBN: 92-9043-307-8.
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, (2007). *Ficha del plátano, MIFIC*, Nicaragua.
- Moreno, J. J. (1766). *Fragmentos de la vida y virtudes del V. ILLmo y Rmo, Sr. Dr. Don Vasco de Quiroga*. Imprenta del Real. Colegio de San Idelfonso.
- Pearson, K., y Filon, L. N. G. (1898). VII. Mathematical contributions of the theory of evolution. IV. On the probable errors of the frequency constants and correlation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, 191(1), 229-311.

MORFOLOGÍA Y ACONDICIONAMIENTO OSMÓTICO DE SEMILLAS DE CHILE PERÓN (*Capsicum pubescens* R. y P.)

Ana Karen Escalera Ordaz¹, Pedro Antonio López² y Héctor Guillén Andrade^{1*}

RESUMEN

Capsicum pubescens posee una amplia variabilidad morfológica de importancia en la generación de nuevas variedades con potencial agronómico, sin embargo, la testa de la semilla es dura y la germinación es más lenta que otras especies del género *Capsicum*. En este sentido, el acondicionamiento osmótico es una técnica utilizada para mejorar y evaluar la calidad fisiológica de semillas al incrementar la uniformidad en el porcentaje de germinación. La investigación se desarrolló con la finalidad de caracterizar y determinar la calidad fisiológica de semillas de *C. pubescens* procedentes de Uruapan, Michoacán, México. La caracterización morfológica de las semillas se hizo con base en los descriptores propuestos por el IPGRI (1995), para color, textura, tamaño, peso de semillas y número de semillas por fruto. Además, se evaluó el porcentaje y los días a inicio de germinación de semillas previamente tratadas con acondicionamiento osmótico bajo tres tratamientos (T1-tratamiento testigo, T2- 100 mg L⁻¹ de KNO₃ y T3-100 mg L⁻¹ de KNO₃). La información obtenida fue analizada mediante procedimientos estadísticos, con el empleo del paquete estadístico SAS. Los resultados obtenidos de la caracterización morfológica indicaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha \leq 0.05$) para las variables

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología. Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín S/N, Emiliano Zapata, 60170 Uruapan, Michoacán. México. Teléfono: (452)5236474.

² Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. km 125.5 carretera federal México-Puebla, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla. México. 72760. Tel. 01(222)2851442. *hguillenandrade@gmail.com

evaluadas. Asimismo, se observaron semillas negras en un 67% de las variedades cultivadas, color marrón en un 26.6% y un 6.4% con tonalidad amarilla. En respuesta a los tratamientos de acondicionamiento osmótico, se obtuvo un inicio de germinación promedio de entre los 9.9 y 10.1 días con un porcentaje de germinación del 95 %. Los tres tratamientos de acondicionamiento osmótico aplicados en semillas de *C. pubescens* indicaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$). Las semillas de *Capsicum pubescens* con mayor capacidad germinativa presentaron textura rugosa, color negro y tamaño de 4 a 5 mm. Además, la concentración de 100 mg L⁻¹ de KNO₃ con un periodo de acondicionamiento osmótico de 24 horas generó mejor respuesta con un porcentaje de germinación de 95.4 a 96.4%.

PALABRAS CLAVE

Caracterización morfológica, germinación, calidad fisiológica.

Introducción

El chile perón es cultivado en el centro de México, la amplia diversidad de microclimas en el estado de Michoacán (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010) favorece la diversa variabilidad de formas, colores y aromas de chiles del género *pubescens* (Escalera-Ordaz & Guillén-Andrade, 2019), los cuales representan un valioso reservorio de germoplasma útil en el mejoramiento de esta especie (Ayala *et al.*, 2017). Las semillas como unidades de reproducción sexual de las plantas son de importancia en la preservación de las especies a la que pertenecen (Doria, 2010), ya que la semilla es el órgano que permite la dispersión, propagación y conservación de las plantas. Además, posee características de reserva para alimentar a la nueva plántula hasta que sea un organismo fotosintéticamente competente o autótrofo (Matilla, 2008). Es importante contar con semilla de buena calidad para la obtención de plantas vigorosas para alcanzar el máximo rendimiento (Doria, 2010); por lo tanto, el estudio de sus características es esencial para comprender su comportamiento y evaluar las posibilidades de éxito futuras en la utilización de técnicas de mejoramiento genético. Para

ello, son de utilidad los descriptores morfológicos, como el propuesto por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 1995). Por otra parte, el conocimiento de la capacidad germinativa de la semilla es de gran importancia para su manejo y conservación (Hernández-Verdugo *et al.*, 2010). Una vez formada la semilla mediante la embriogénesis, esta acumula sustancias nutritivas en los órganos de reserva y paraliza su desarrollo durante un periodo de tiempo (dormancia) como un proceso de importancia para su supervivencia. Las estructuras celulares de la semilla adquieren tolerancia a la desecación, no se deterioran y, una vez rehidratada la semilla, se reactiva la actividad celular e inicia el proceso germinativo con la absorción de agua y termina cuando el embrión emerge (Matilla, 2008). Este proceso es regulado por hormonas, no obstante, en el género *Capsicum* se han hecho estudios donde la germinación es lenta y se considera como uno de los principales problemas a nivel comercial. Por lo anterior, la exposición previa de semillas a hormonas vegetales provoca un efecto benéfico al promover e incrementar significativamente la germinación y mejorar el vigor de la semilla (Huez-López *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010; De la Rosa *et al.*, 2012; Cano-Vázquez *et al.*, 2015). Además del uso de hormonas, han sido documentados distintos ensayos de germinación que permiten evaluar el poder germinativo de las semillas para estimar su valor potencial para la siembra en campo (Rodríguez *et al.*, 2008) y la calidad fisiológica (Moreno-Medina & Jiménez-Suancha, 2013). Uno de los principales procedimientos es colocar las semillas en el interior de una caja de vidrio o plástico transparente sobre un soporte que permita la retención de agua, por ejemplo: papel filtro, arena o medios gelificados a base de agar (Rodríguez *et al.*, 2008). Por otra parte, el acondicionamiento osmótico es un procedimiento para mejorar la calidad fisiológica de las semillas incrementando además el porcentaje de germinación (Moreno-Medina & Jiménez-Suancha, 2013). Otras técnicas utilizadas para romper la dormancia en las semillas son la estratificación, escarificación, imbibición y lixiviación (Varela & Arana, 2011). Con base a lo descrito, en el presente trabajo de investigación fue planteada la caracterización morfológica de semillas de chile perón con objeto de contribuir al conocimiento sobre

los recursos genéticos, además de evaluar la calidad fisiológica de las semillas aplicando la técnica de acondicionamiento osmótico bajo diferentes dosis de nitrato de potasio (KNO_3) como alternativa para identificar características morfológicas de importancia para determinar el potencial germinativo, así como reducir el tiempo de germinación en el desarrollo de trabajos futuros de mejoramiento genético o para la utilización de los mismos en programas de producción.

Metodología

Área de estudio y material genético

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos (LAREFI) de la Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología (UIAA) de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH ubicada en Uruapan, Michoacán, México. El material genético incluido en el presente estudio consistió en 31 variedades cultivadas de *Capsicum pubescens*, provenientes de los municipios de Uruapan y Tingambato, Michoacán, México.

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las semillas de *C. pubescens* fue hecha con base al descriptor para este género, propuesto por el IPGRI (1995). Las variables evaluadas fueron: color de semilla, textura, tamaño, número y peso total de las semillas por fruto.

Tratamientos pre-germinativos

El establecimiento de los tratamientos para evaluación de potencial germinativo se hizo con base en diferentes protocolos (Sánchez-Marín *et al.*, 2007; Kameswara *et al.*, 2007; Moreno-Medina & Jiménez-Suanca, 2013). Los tratamientos consistieron en un testigo y dos dosis de KNO_3 (100 y 200 mgL^{-1}) en acondicionamiento osmótico por

un periodo de 24 horas. El diseño establecido fue completamente al azar con 10 repeticiones, sumando un total de 93 unidades experimentales con 10 semillas cada una. Las unidades experimentales se monitorearon día con día para evaluar la respuesta de germinación de las semillas a los distintos tratamientos durante un periodo de 20 días, tiempo suficiente para completar el 80% de semillas germinadas, las variables evaluadas fueron el porcentaje y los días a inicio de la germinación.

Análisis de datos

Con la base de datos obtenida para días a inicio de germinación, se hizo un análisis de varianza en una vía con el paquete estadístico SAS Studio (SAS Institute Inc., 2021).

Resultados y discusión

Características morfológicas de semilla de chile perón

La evaluación de las características morfológicas medidas en semillas de *C. pubescens* permitió identificar diferencias morfológicas entre las variedades cultivadas evaluadas. Con base en la literatura, el fruto de *C. pubescens* presenta semillas de color negro, morado y marrón (Hernández-Verdugo *et al.*, 2014; Villota-Cerón *et al.*, 2012). Los resultados indicaron la presencia de semillas negras en un 67% de las variedades cultivadas, un 26.6% color marrón y un 6.4% presentó una tonalidad amarilla. Asimismo, la textura rugosa se presentó en un 87 % de las variedades cultivadas, lisa en 9.8% y áspera en 3.2 %. Se identificó un tamaño de semilla de 4 a 6 mm (intermedio) más frecuente al presentarse en 20 variedades cultivadas, el tamaño grande (7 a 8 mm) se identificó en siete variedades y el tamaño pequeño (2 a 3 mm), en cuatro. Esta información contrasta con lo indicado por Hernández-Verdugo *et al.*, (2014) que señala que *C. pubescens* presenta semillas con diámetros entre 2 y 3 mm. El peso de las semillas fluctuó entre 0.8 y 1.2 gramos en la

mayoría de las variedades cultivadas; sin embargo, algunas llegaron a pesar entre 1.4 y 1.8 g, finalmente, el número de semillas predominante por fruto fue de 50 a 80. En la Figura 1 se muestra la variabilidad de colores, tamaños y número de semillas por fruto presente en las variedades cultivadas evaluadas. El número de las semillas puede variar dependiendo el origen de la planta, ya que se han identificado frutos con 74 a 84 semillas por fruto en plantas progenitoras, mientras que en plantas híbridas el número de semillas reportado es de 24 a 39 (Ayala *et al.*, 2017). Los factores climáticos de los sitios de colecta también influyen en el peso de las semillas (Hernández-Verdugo *et al.*, 2012). Además, existe una correlación positiva significativa del número de semillas con el grosor de pericarpio, asociando este carácter como el de mayor influencia en la cantidad de semillas por fruto (Ayala *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos del análisis de varianza en una vía, hecho para cinco variables medidas en semilla de chile perón, se presentan en la Tabla 1, donde se indican diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) para color de la semilla, tamaño, peso y número total de las semillas por fruto. Los coeficientes de determinación (R^2), oscilaron entre $R^2 = 0.29$ y $R^2 = 0.70$. Asimismo, el coeficiente de variación fluctuó entre $CV = 15.71\%$ y 28.98% ; valores correspondientes a peso total de semillas por fruto y color de semilla respectivamente, lo cual indica mayor variación para estas características. Los valores correspondientes a la desviación estándar (DE) para cada variable oscilaron entre $DE = 0.33$ y $DE = 17.31$ para peso total de las semillas por fruto y número total de semillas por fruto, respectivamente. Las características evaluadas en semillas de variedades cultivadas de *C. pubescens* son más uniformes y presentan menor variación debido posiblemente a los procesos de selección que ejercen algunos productores de chile perón. En contraste, los chiles silvestres presentan mayor variación, por ejemplo: *C. annum* var. *glabriusculum* presenta coeficientes de variación de $CV = 38.7$ y $CV = 42$ para las variables peso y número de semilla, respectivamente (Hernández-Verdugo *et al.*, 2012).

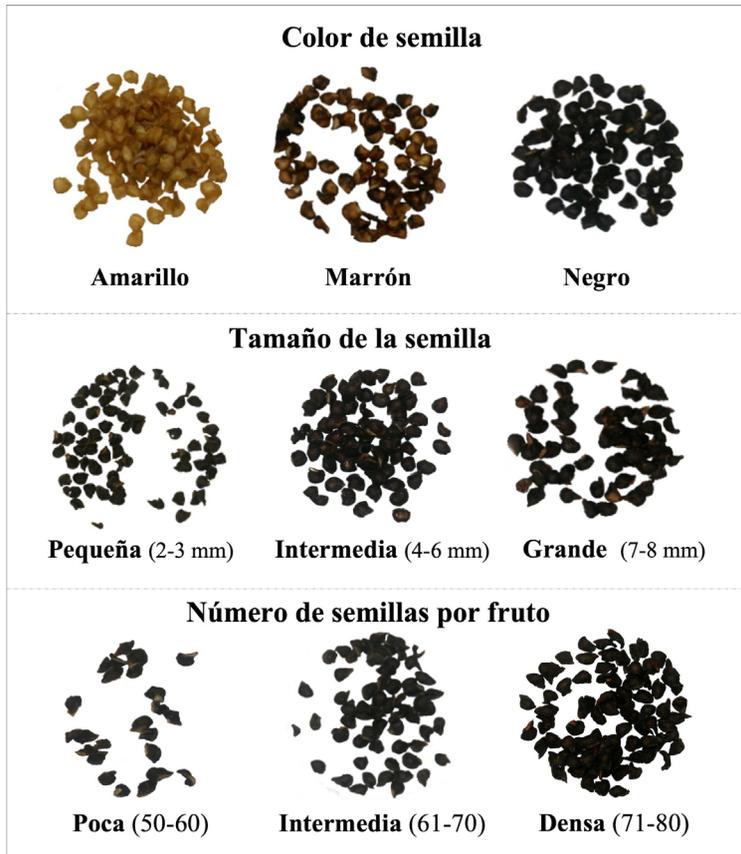


Figura 1. Variabilidad de colores, tamaños y número de semillas por fruto en semillas de *C. pubescens* originarias de las regiones de Tingambato y Uruapan, Michoacán México

Tabla 1. Estadísticos simples obtenidos en cinco variables evaluadas en semilla de *Capsicum pubescens* procedentes de los municipios de Tingambato y Uruapan, Michoacán, México

Variable	R ²	C.V. ²	D. E.	Media	Pr > F
Color	0.6204	15.7172	0.4056	2.5806	<.0001
Textura	0.2940	25.232	0.5111	2.0258	0.0207
Tamaño	0.7076	18.3262	0.3724	2.0322	<.0001
Peso	0.4863	28.9813	0.3306	1.1407	<.0001
Número	0.4028	26.9095	17.31063	64.3290	<.0001

¹Coefficiente de determinación, ²Coefficiente de variación, ³Desviación estándar.

Germinación de semilla de chile perón en respuesta a tratamientos pre-germinativos

Los resultados obtenidos de la prueba de acondicionamiento osmótico en semillas de *C. pubescens* indican inicio de germinación entre los seis y ocho días en 12.90% de las semillas evaluadas; destacan las semillas de color negro, textura rugosa, tamaño de semilla intermedia, peso total de las semillas por fruto entre 1.07 y 1.57 gramos y un número promedio de 65 semillas por fruto procedentes de altitudes de entre 2 089 y 2 122 m.s.n.m. El 29% de las semillas germinó entre los ocho y diez días, los frutos de las semillas que germinaron en este periodo de días pertenecen al municipio de Uruapan y fueron ubicados entre los 1 600 y 2 000 m.s.n.m. con un promedio de 60 semillas por fruto. Asimismo, el 38.7% de las semillas germinó entre 10 y 14 días, los frutos de las semillas germinadas en este periodo de tiempo fueron ubicados entre los 1 600 y 2 200 m.s.n.m., con un promedio de 70 semillas por fruto. Finalmente, 19.4% de las semillas germinaron entre los 14 y 18 días, estas semillas provienen de frutos procedentes del municipio de Tingambato, ubicadas entre 1 900 y 2 300 m.s.n.m. Con base en los resultados obtenidos es posible corroborar que la capacidad germinativa e inicio de germinación es influenciado por características morfológicas de las semillas, así como la altitud sobre el nivel del mar y condiciones climáticas del sitio de colecta (Hernández-Verdugo *et al.*, 2010; Hernández-Verdugo *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos del análisis de varianza en una vía, hecho para tres tratamientos de acondicionamiento osmótico para los días a inicio de germinación de *C. pubescens*, indican diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) en los tres tratamientos (Tabla 2). Los valores del coeficiente de determinación (R^2) fluctuaron entre $R^2 = 0.41$ y $R^2 = 0.53$. Asimismo, los coeficientes de variación oscilaron entre 29 y 32.54%. En el tratamiento uno se observó mayor variación para los días a inicio de la germinación en las 31 variedades cultivadas evaluadas. El promedio de días a germinación en las semillas evaluadas fue de 12 días, respuesta muy favorable al tomar en cuenta que la semilla de *Capsicum* es más lenta que otras solanáceas

(Cano-Vázquez *et al.*, 2015), tardando entre 35 y 45 días sin emplear ningún tratamiento pre-germinativo. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican la efectividad del acondicionamiento osmótico KNO_3 para acelerar la germinación de semillas de *C. Pubescens*; sin embargo, la uniformidad en la germinación se muestra influenciada al evaluar semillas de diferentes sitios de origen. El acondicionamiento osmótico mejora la calidad fisiológica de las semillas; no obstante, esta se ve afectada por el origen de las semillas (Cano-Vázquez *et al.*, 2015), el periodo de tiempo en acondicionamiento osmótico (Sánchez-Marín *et al.*, 2007), el agente hormonal (De la rosa *et al.*, 2012; Cano-Vázquez *et al.*, 2015) o compuestos químicos como el KCL (Sánchez-Marín *et al.*, 2007; Moreno-Medina y Jiménez-Suancha, 2013), el NaCL (De la rosa *et al.*, 2012) o KNO_3 (Sánchez-Marín *et al.*, 2007; Moreno-Medina & Jiménez-Suancha, 2013 y Andrade & Hernán, 2015).

Tabla 2. Estadísticos simples determinados en tres tratamientos de acondicionamiento osmótico aplicados en semilla de *Capsicum pubescens* para días a inicio de germinación

Variable	R ²¹	C.V. ²	D. E.	Media	Pr > F
T1 (0 mg de $\text{KNO}_3 \text{ L}^{-1}$)	0.4180	32.5493	3.8597	11.8580	<.0001
T2 (100 mg de $\text{KNO}_3 \text{ L}^{-1}$)	0.5376	29.1838	3.4954	11.9774	<.0001
T3 (200 mg de $\text{KNO}_3 \text{ L}^{-1}$)	0.4703	30.4603	3.7682	12.3709	<.0001

¹Coefficiente de determinación, ²Coefficiente de variación, ³Desviación estándar.

Conclusión

El acondicionamiento osmótico durante 24 horas, así como las semillas de color negro y textura rugosa procedentes de alturas entre 2 089 y 2 122 msnm fueron factores que aceleraron el proceso de germinación.

Agradecimientos

A la UIAA-Facultad de Agrobiología-UMSNH por el apoyo con las instalaciones para la ejecución de las actividades de investigación. Al CONAHCYT por la beca otorgada para estancia posdoctoral.

Referencias

- Andrade S. & L. Hernán. (2015). Efectos del nitrato de potasio sobre la germinación de semillas de tres cultivares de ají dulce (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología*, 33, 25-35.
- Ayala, A. B., Carranza, J. M., Estrada, I. M., Arriaga, M. R., & García, L. M. V. (2017). Caracterización morfológica de híbridos de chile manzano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(4), 825-836.
- Cano-Vázquez, A., López-Peralta, Ma. C., Zavaleta-Mancera, H. A., Cruz-Huerta, N., Ramírez-Ramírez, I., Gardea-Béjar A., & González-Hernández V. A. (2015). Variación en grados de latencia en semillas entre colectas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*). *Botanical Science*, 93(1), 175-184.
- De la Rosa M., Arce, L., Villarreal, J. A., Ibarra, L., & Lozano, J. (2012). Germinación de semillas de chile simojovel (*Capsicum annuum* L.) previamente expuestas a NaCl y ácido giberélico. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 81(2), 165-168.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85.
- Escalera-Ordaz, A. K. & Guillén-Andrade, H. (2019). Formas y colores del chile perón. *Revista Saber Más*, 48(8), 42-44.
- García F. A., Montes, S., Rangel, J. A., García E., & Mendoza M. (2010). Respuesta fisiológica de la semilla chile piquín (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill) al ácido giberélico e hidrotermia. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(2), 203-216.
- Gutiérrez-Contreras M., Lara-Chávez, Ma. B. N., Guillén-Andrade, H., & Chávez-Barcenas, A. T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, 35 (9), 647-653.
- Hernández-Verdugo S., López-España, R. G., Porras, F., Parra-Terraza, S., Villareal-Romero, M., & Osuna-Enciso T. (2010). Variación en la germinación entre poblaciones y plantas de chile silvestre. *Agrociencia*, 44(6), 667-677.
- Hernández-Verdugo, S., Porras, F., Pacheco-Olvera, A., López-España, R. G., Villarreal-Romero, M., Parra-Terraza, S., & Osuna Enciso,

- T. (2012). Caracterización y variación ecográfica de poblaciones de chile (*Capsicum annum* var. *Glabriusculum*) silvestre del noroeste de México. *Polibotánica*, 1(33), 175-191.
- Hernández-Verdugo, S. (2014). Importancia del chile silvestre (*Capsicum annum*) como recurso genético de México. *Mensaje Bioquímico*, 41(1), 289-304.
- Huez-Loópez M. A., Samani, Z., López-Elias, J., Álvarez-Avilés A., y Preciado-Flores, F. (2008). Efecto de un extracto vegetal en la germinación de semillas de chile (*Capsicum annum* L.) bajo condiciones salinas. *Bioteconia*, 3, 11-19.
- Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos/Centro Asiático de Investigación y Desarrollo de Vegetales/Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. (1995). *Descriptor para Capsicum (Capsicum spp.)*. IPGRI- AVRDC-CATIE. ISBN 92-9043-216-0. 110 p.
- Kameswara, N., Hanson, J., Dulloo, E., Ghosh, K., Nowell, D., y Larinde, M. (2007). Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma. *Biodiversity International*, 8(1), 1- 165. [https://doi.org/ISBN 978-92-9043-757-4](https://doi.org/ISBN%20978-92-9043-757-4).
- Matilla A. J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. En Azcon-Bieto, J. & Talón, M. (eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal* (537-558 pp). Editorial McGraw-Hill Interamericana. ISBN 978-84-481-5168-3.
- Moreno-Medina, B. L., y Jiménez-Suancha, S. C. (2013). Efecto del acondicionamiento osmótico en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad santa clara. *Conexión Agropecuaria JDC*, 3(2), 11-17.
- Rodríguez, I., Gilles, A., y Duran J. A. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista agropecuaria*, 78, 836-842.
- Sánchez-Marín S. J., Contreras, J. A. M., Livera, A. H., Lomelí A. P., & Carballo A.C. (2007). Acondicionamiento osmótico de semillas de tomate de cáscara. *Agricultura Técnica en México*, 33, 115-123.
- Varela, S. A. & Arana, V. (2011). *Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Silvicultura en Vivero. Sistemas Forestales*

Integrados. INTA. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Latenciaygerminaci%C3%B3ndesemillas.pdf>

Villota-Cerón D., Bonilla-Betancourt, M. L., Carmen-Carrillo, H., Jaramillo-Vázquez J., & García-Dávila, M. A. (2012). Caracterización morfológica de introducciones de *Capsicum* spp. existentes en el Banco de Germoplasma activo de Corpoica C.I. Palmira, Colombia. *Acta agronómica*, 61(1), 16-26.

EVALUACIÓN PROXIMAL DE VARIEDADES DE *Musa* spp. CULTIVADAS EN ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MÉXICO

Héctor Guillén Andrade¹, Abel Jefte Melchor Corral¹, Berenice Yahuaca Juárez², Ana Karen Escalera Ordaz^{1*} y Elizabeth Martínez¹

RESUMEN

El género *Musa* tiene su origen en el Sudeste Asiático, los plátanos y bananos son los cultivos más importantes ya que representan una fuente de alimentación y nutrición para millones de personas. Desde su centro de origen, fueron llevados a diferentes zonas de América Central y Sudamérica. En 1554 el obispo español Vasco de Quiroga introdujo algunas variedades de *Musa* spp., en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México. El objetivo de esta investigación fue generar información sobre la composición proximal de frutos de variedades de *Musa* spp., cultivadas en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Para esto se realizó un recorrido de campo en la región, con la finalidad de localizar, identificar y recolectar frutos de cuatro variedades conocidas localmente como: Costillón, Costillón Cenizo, Enano Gigante y Morado; adicionalmente, fueron utilizadas como referencia para los análisis proximales dos variedades de importancia comercial: Macho y Tabasco, las cuales fueron obtenidas en un mercado local de la ciudad de Uruapan. Los análisis proximales hechos fueron los siguientes: contenido de humedad, materia seca, cenizas, pH y grados Brix. La información obtenida fue analizada mediante procedimientos estadísticos univariados y multivariados con el empleo del paquete estadístico SAS Studio (SAS Institute Inc., 2021). Los resultados indicaron que los frutos de las variedades analizadas pre-

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín S/N, Colonia Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán. México. 60170. *ana.karen.escalera.ordaz@gmail.com

² Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Químico Farmacobiología. Tzintzuntzan 173. Colonia Mariano Matamoros. 80240. Morelia, Michoacán México.

sentaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha \leq 0.05$) en todos los parámetros evaluados. El análisis de correlación mostró una relación directa entre el contenido de humedad con materia seca ($r = -0.99$). Finalmente, se identificaron tres grupos; en el grupo I se asociaron las variedades Morado, Tabasco y Enano Gigante; en el grupo II, la variedad Macho y, en el grupo III, las variedades Costillón y Costillón Cenizo. La variedad Morado presentó similitudes proximales con las variedades Enano Gigante y Tabasco, mientras que la variedad Macho con las variedades Costillón y Costillón Cenizo. Las variedades Enano Gigante y Tabasco presentaron la mayor similitud proximal.

PALABRAS CLAVE

Plátanos, bananos, genotipos, análisis proximal, calidad.

Introducción

El género *Musa* pertenece a la familia botánica Musáceae y al orden Zingiberales. Este género está formado por cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*. La sección *Eumusa* es la de mayor importancia económica y difusión geográfica, ya que en ella están incluidos los plátanos y bananos comestibles. En esta sección, las especies silvestres *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla son las más importantes porque por hibridación y poliploidía dieron origen a los plátanos y bananos que son cultivados actualmente alrededor del mundo (Vásquez-Castrejón *et al.*, 2005).

El género *Musa* es originario del Sudeste de Asia, región que comprende el norte de la India, Burma, Camboya, parte del sur de China, así como las Islas mayores de Sumatra, Java, Borneo, las Filipinas y Taiwán. Desde su centro de origen, el plátano y el banano fueron llevados al resto del continente asiático, Polinesia, África y Europa (Delgado *et al.*, 2011), y, posteriormente, a Santo Domingo, República Dominicana, en el año 1516 (Soto, 1985).

En 1554 el obispo español Vasco de Quiroga introdujo a México cinco variedades de plátano procedentes de Santo Domingo, las cuales fueron establecidas en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán,

México (Moreno, 1766). Las variedades de plátano y banano que son cultivadas alrededor del mundo provienen de las especies silvestres *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, estas dieron origen a todas las variedades comestibles (Belalcázar, 1991) a partir de hibridaciones interespecíficas que se generaron entre ellas, así como por mutaciones espontáneas: poliploidía, esterilidad y la partenocarpia (Rodríguez y Rodríguez, 2000).

El fruto de plátano es una baya partenocárpica alargada; se forma sin que ocurra el proceso de polinización de las flores femeninas, por lo que los puntos negros en su interior son óvulos abortados (Mejía, 2018). Generalmente es alargado, curvo y semiredondo en su sección transversal, su longitud oscila de 5 a 30 cm (CEDAF, 2001), la cáscara es dura y brillante, mientras que la pulpa varía en color: desde el blanco, crema, marfil hasta el beige-rosado (Karamura *et al.*, 2011); además del sabor, olor y textura, dependiendo del grado de madurez y de la variedad (González, 2004).

Las variedades más importantes del género *Musa* son los plátanos y los bananos, ya que han sido considerados el cuarto cultivo más importante en el mundo —después del arroz, trigo y maíz—, por ser uno de los más consumidos. Estas Musáceas comestibles representan una fuente de alimentación y nutrición para más de 400 millones de personas (Bioversity, 2015). En la gastronomía mundial, estos frutos son empleados en diferentes preparaciones culinarias, esto depende de la zona en donde son cultivados. Para su consumo, se dividen en dos grupos principales: los bananos de postre o dulce y los plátanos para cocinar (Nakasone & Paull, 1999). En México son utilizados tiernos, verdes, sazones y/o maduros, en una gran diversidad de platillos, por ejemplo: como acompañantes de guisos o en la preparación de atoles, dulces, licuados, nieve, churros, mole verde, pescado al plátano, panes, roscas, flanes, tartas, mermelada, frituras, entre otros (Delgado *et al.*, 2011).

Nutricionalmente, aportan un bajo contenido de proteínas y lípidos (Moreiras *et al.*, 2013). Sin embargo, al ser consumidos son fuente importante de diversos compuestos benéficos para la salud humana como el potasio, hierro y vitamina K (COVECA, 2010).

Un plátano, puede proporcionar hasta el 23% de potasio que se necesita al día para una correcta nutrición, lo cual beneficia a los músculos, ayudando a mantener su buen funcionamiento y evitando los espasmos musculares, disminuye la presión arterial y reduce el riesgo de accidentes cerebrovasculares (Kumar *et al.*, 2012). Asimismo, beneficia a los huesos y músculos por ser rico en vitaminas A, C, D y B6, ayuda a mejorar el humor en personas con depresión y síndrome premenstrual (Moline & Zendell, 2000). Además, son utilizados como remedio contra la diarrea (Rabbani *et al.*, 2010) por su alto contenido de almidón resistente que, al ser fermentado en el colon, produce ácidos grasos de cadena corta que estimulan la absorción de sales y agua (Binder, 2010). El almidón es un polímero de origen natural cuyas aplicaciones en la ciencia de los alimentos y polímeros son diversas. Lo anterior incrementa la importancia industrial del cultivo del plátano al ser utilizado en la elaboración de harinas (Araza, 1995), pastas alimenticias (Ovando *et al.*, 2007), papel, plásticos, manufactura de dextrinas y colas, entre otras (Hernández *et al.*, 2017). La demanda de almidón en la industria moderna ha ido en aumento, por lo que se ha generado un interés por identificar nuevas fuentes de extracción de este polisacárido (Betancur *et al.*, 2004), tanto en su forma nativa como modificada (Aguirre *et al.*, 2007). En este sentido, el plátano verde contiene hasta un 70% de almidón, por lo que se considera una fuente importante de este glúcido (Bello-Pérez, 1999).

El plátano y el banano fueron incluidos en el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura y priorizados dentro de los 20 cultivos más importantes de las Américas de un total de 85 cultivos (Ramírez, 2008). Debido a lo anterior, instituciones de carácter nacional e internacional han iniciado acciones dirigidas al rescate y uso de esa gran biodiversidad, por ejemplo: la Estrategia Hemisférica de Conservación de Recursos Fitogenéticos en las Américas (Ramírez, 2008) en la que se busca la aplicación de técnicas viables y seguras para la conservación de los recursos fitogenéticos tropicales (Engelmann & Takagi, 2000). En este sentido, y con el conocimiento de la variabilidad de bananos y plátanos cultivados en la región de Ziracuaretiro, Michoacán, México,

se planteó la necesidad de generar información de algunas de las variedades introducidas y cultivadas en esa región sobre las cualidades proximales y para una mejor estrategia de conservación y aprovechamiento de estos importantes recursos fitogenéticos.

Metodología

Área de estudio

El municipio de Ziracuaretiro está ubicado en el centro del estado de Michoacán, entre los paralelos 19° 21' y 19° 31' de latitud norte y los meridianos 101° 48' y 102° 00' de longitud oeste, a una altitud de 1380 msnm. Su edafología se compone por los siguientes tipos de suelos: andosol (52.03%), luvisol (23.31%), leptosol (16.31%) y cambisol (4.86%). El clima es tropical con abundantes lluvias en verano, con un rango de temperatura de 16 a 24 °C y de precipitación anual que oscila entre 1200 a 2000 mm.

Material genético

El material genético empleado en este trabajo de investigación consistió de frutos en madurez fisiológica de seis variedades de *Musa* spp., cuatro cultivadas en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán: Costillón, Costillón Cenizo, Enano Gigante y Morado y dos variedades de importancia comercial: Macho y Tabasco. Los frutos de las variedades comerciales fueron adquiridos en un mercado local y sirvieron como referencia para los análisis proximales.

Análisis proximal

El análisis proximal consistió en la determinación del contenido de humedad, materia seca, cenizas, pH y °Brix de frutos de seis variedades de *Musa* spp., cuatro cultivadas en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán: Costillón, Costillón Cenizo, Enano Gigante y Morado y dos variedades de importancia comercial: Macho y Tabasco. Cada

una de las muestras analizadas incluyeron tres frutos, todos fueron cortados en rebanadas delgadas y liofilizadas en un equipo LAB-CONCO® a -45 °C y una presión de 37 pascales durante 72 h. Posteriormente, el tejido liofilizado fue pulverizado con ayuda de un molino KRUPS® para finalmente ser almacenadas en tubos Falcon a -20 °C, hasta su utilización.

Análisis de la información

Para analizar la información obtenida de los diferentes análisis, se generó una base de datos para análisis de varianza en una vía mediante el procedimiento PROC ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Con el propósito de determinar las posibles relaciones entre las variables estudiadas, se hizo un análisis de correlación de Pearson y, finalmente, un análisis de conglomerados (AC) mediante el procedimiento PROC CLUSTER con el objetivo de generar el dendograma correspondiente con el método de agrupamiento de Ward, el cual fue analizado con base en la prueba de pseudo F para estimar la verosimilitud de los grupos formados. Todos los análisis fueron llevados a cabo con el paquete estadístico SAS Studio (SAS Institute Inc., 2021).

Resultados y discusión

Contenido de humedad

Las variedades analizadas presentaron contenidos de humedad que oscilaron entre el 69 y 75%, el valor promedio para esta característica fue de 66%. Estos resultados concuerdan con los reportados para esta especie (Espinosa-Moreno *et al.* 2018; García 2013; Jesus *et al.* 2004; Casallas 2014; Abano & Sam-Amoah, 2011). En lo que respecta a las variedades Macho y Morado, presentaron valores promedio desde 56.4 hasta 68.5%. La composición química de la pulpa de plátanos y bananos varía dependiendo del estado de maduración y de la variedad evaluada (Von Loesecke, 1989).

Materia seca

Este parámetro varió entre 26.4 y 51.5%, con un valor promedio de 33.97% para las seis variedades evaluadas. Estos resultados son similares a los reportados por Espinosa-Moreno *et al.*, (2018); en contraste, Abano y Sam-Amoah (2011) y Belayneh *et al.*, (2013) indican valores de 25 y 29% para distintas variedades de banano y plátano. La materia seca está completamente relacionada con el contenido de humedad, lo cual se ve reflejado en los valores obtenidos en ambos parámetros.

Contenido de cenizas

Los resultados de este parámetro arrojaron valores de entre 2 y 4% con un valor promedio de 2.97%. Estos valores son similares con lo reportado por otros autores para genotipos y variedades de plátano y banano (Colmenares *et al.*, 2009; Gibert *et al.*, 2009; Martínez-Cardozo *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2000; Rosales-Reynoso *et al.*, 2014; García, 2013; Casallas, 2014; Lucas-Aguirre *et al.*, 2016). Las condiciones del suelo donde se encuentra establecido el cultivo son un factor que afecta la absorción y el contenido de minerales del fruto; de igual manera, el estado de maduración del fruto influye sustancialmente en el contenido de cenizas de los frutos de plátano y banano.

pH. En lo que respecta al pH de la pulpa de los materiales analizados, los valores oscilaron entre 4 y 5.5% con un promedio de 4.68%. Estos resultados son similares a los reportados por distintos autores (Jesus *et al.*, 2004; Millán & Ciro, 2012; Valerio-Dávila, 2014).

A medida que el proceso de maduración progresa, se genera ácido málico y el contenido de azúcares y la acidez incrementan, disminuyendo así el pH, ya que durante la etapa de madurez fisiológica el pH de los frutos tiende a ser elevado (Barrera *et al.*, 2010; Quiceno *et al.*, 2014). Es importante resaltar que las variedades comerciales Tabasco y Morado presentaron los valores más altos con pH de 5.0; en contraste, la variedad Costillón presentó valores de pH de 4.03.

°Brix. Los valores obtenidos en sólidos solubles totales oscilaron entre 22.8 – 38.1 con un valor promedio de 29.25, en contraste con

algunos autores, quienes reportan valores desde 9 hasta 27.4 (Jesus *et al.*, 2004; Valerio-Dávila, 2014). Una vez cosechado, el plátano presenta contenidos altos de almidón y valores bajos de °Brix (Barrera *et al.*, 2010). Valores altos de °Brix son deseables para el consumo en fresco de este fruto ya que en conjunto con los ácidos orgánicos son responsables de su aroma y sabor, además de ser requeridos en la industria para aumentar el rendimiento en la elaboración de distintos productos (Chitarra & Chitarra, 1990; Paiva *et al.*, 1997). Es importante señalar que los análisis estadísticos arrojaron diferencias significativas para todas las características analizadas en las variedades cultivadas en la región de Ziracuaretiro, Michoacán; esto último indica que estas diferencias son probablemente causadas por la composición genética de cada una de ellas, ya que todas las variedades estuvieron cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales, por lo que se considera que la influencia de este último factor queda descartado. En este sentido, también se puede indicar que las diferencias en las características proximales determinadas entre las variedades pueden deberse a que el contenido químico de los frutos cambia de acuerdo con la variedad, estado de maduración, prácticas agrícolas y manejo postcosecha y ambiente (Arvanitoyannis & Mavromatis, 2009). En la Figura 1 se presentan los grupos de variedades de acuerdo con la similitud con base en la información de los seis análisis proximales hechos.

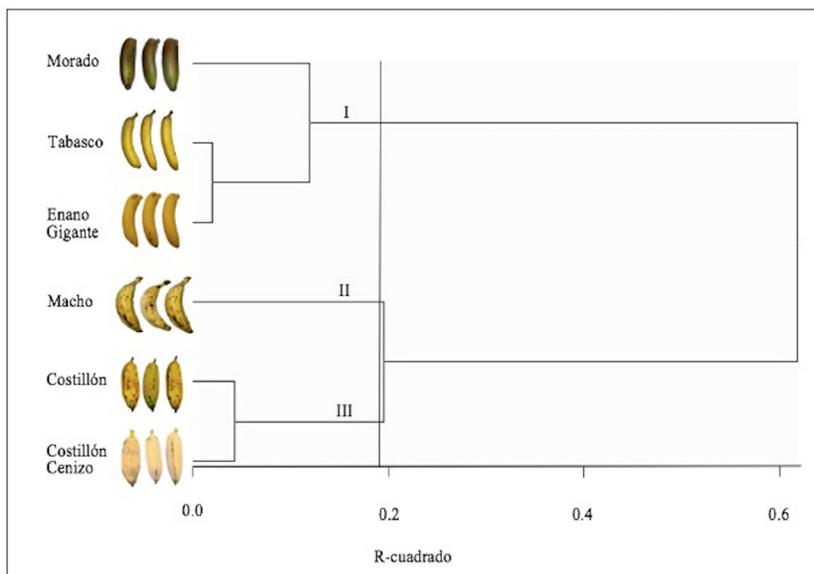


Figura 1. Dendrograma de similitud obtenido con base en cinco características proximales evaluadas en seis variedades de *Musa* spp., cuatro cultivadas en la región del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán: Costillón, Costillón Cenizo, Enano Gigante y Morado y dos de importancia comercial: Macho y Tabasco

El análisis de correlación indicó una correlación altamente significativa ($P < 0.001$), entre humedad y materia seca ($r = -0.99$). En contraste, fueron identificadas cinco correlaciones significativas ($P \leq 0.05$) ceniza con pH ($r = 0.76$), ceniza con humedad ($r = 0.60$), ceniza con materia seca ($r = -0.60$), pH con °Brix ($r = 0.59$) y cenizas con °Brix ($r = 0.59$). La humedad se relaciona con la materia seca, el aumento de peso y la pérdida de firmeza de frutos de banana. La relación pulpa/cáscara se modifica durante la maduración, esto se debe a que el almidón es degradado en azúcares, la concentración de estos aumenta con mayor rapidez en la pulpa en comparación con la cáscara, lo que provoca un cambio en la presión osmótica, el agua presente en la cáscara se pierde por transpiración a la atmósfera y por ósmosis hacia la pulpa (Stover & Simmonds, 1987); además, ocurre la degradación de las paredes celulares y la reducción de la cohesión

de la lamela media debido a la solubilización de sustancias pépticas (Smith *et al.*, 1989), la pulpa aumenta en peso fresco, pero pierde firmeza (Cachay, 2017; Abano & Sam-Amoah, 2011). Además, la humedad tiene relación con el color de la pulpa ya que esta cambia de blanco-opaco a amarillo poco intenso debido a la hidrólisis del almidón y síntesis de azúcar por acción del agua (Salvador *et al.*, 2007).

Conclusiones

De acuerdo con los resultados del presente estudio, podemos concluir que existe una gran variabilidad de valores proximales entre las variedades introducidas y cultivadas tradicionalmente y bajo condiciones de traspatio en la región de Ziracuaretiro, Michoacán, México, que obligan a su estudio como una fuente importante de genes para continuar los trabajos de conservación de este importante recurso fitogenético.

Agradecimientos

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) por el financiamiento parcial del proyecto.

Referencias

- Abano, E. y Sam-Amoah, L. (2011). Effects of different pretreatments on drying characteristics of banana slices. *Revista de Ingeniería y Ciencias Aplicadas*, 6(3), 121-129.
- Anaya, O. (1995). Informe sobre existencias del banano de rechazo, su utilización actual y perspectivas para su uso racional. En *CITA, Alternativas de industrialización del banano y el plátano* (pp. 2-28). San José, Costa Rica.
- Aguirre, A., Bello, A., González, L. y Álvarez, R. (2007). *Modificación química del almidón presente en la harina de plátano macho (Musa Paradisiaca L.) y su efecto en el contenido de fibra dietética*. Memorias IX

- congreso de ciencia de los alimentos y v foro de ciencia y tecnología de alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, México. pp. 63 -70.
- Ayo-Omogie, H.N., Adeyemi, I. & Otunola, E. (2010). Effect of ripening on some physicochemical properties of cooking banana (*Musa* ABB Cardaba) pulp and flour. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 45(12), 2605-2611.
- Barrera, L., Arrazola, G. & Cayón, D. (2010). Caracterización físico-química y fisiológica del proceso de maduración de plátano Hartón (*Musa* AAB Simmonds) en dos sistemas de producción. *Acta Agronómica*, 59(1), 20-29.
- Betancur, D., Gallegos, S. y Chel, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: Partial characterization of starch and protein. *Revista de la Ciencia de la Alimentación y la Agricultura*. 84(1), 1193–1201.
- Belalcazar, C. (1991). *El cultivo de plátano en el trópico*. Colombia. IICA, 375p.
- Belayneh, M., Workneh, T. y Belew, D. (2013). Physicochemical and sensory evaluation of some cooking banana (*Musa* spp.) for boiling and frying process. *Revista de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 51(12), 3635-3646.
- Bello-Pérez, L., Pano, Y., Agama, E. y Paredes, O. (1999). Isolation and partial characterization of banana starches. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 47(3), 854-7.
- Binder, H.J. (2010). Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Revista anual de fisiología*. 72 (1), 297-313.
- Cachay, L. (2017). *Maduración controlada y color en bananos* [tesis de licenciatura. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto]. Repositorio UNSM. <http://hdl.handle.net/11458/2499> Perú. 67 p.
- Colmenares, M., Marín, J., Martínez, E., Martínez, G. & Pérez, E. (2009). Evaluación de la composición proximal, almidón total y color de las harinas obtenidas de la pulpa de clones de musáceas. En: Conferencia CIBIA VII. Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, Volumen 18: Alimentos Hoy, *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. <https://>

- www.researchgate.net/publication/230814504_Evaluacion_de_la_composicion_proximal_almidon_total_y_color_de_las_harinas_obtenidas_de_la_pulpa_de_clones_de_musaceas
- Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, (2010). *Monografía del plátano*. Veracruz, México. pp. 2-6.
- Delgado, A., Merlín, R. y Priego, J. (2011). *Recetario sotaentino del plátano macho en Cocina Indígena y Popular*. Dirección General de Culturas Populares Programa de Desarrollo Cultural del Sotavento
- Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Mayo-Mosqueda, A., García-Correa, C., Martínez-Morales, A., García-Alamilla, P. & Lagunes-Gálvez, L. (2018). Calidad de harina de tres cultivares de banano (*Musa* spp.) resistentes a la enfermedad sigatoka negra en Tabasco. *Agrociencia*, 52(2), 217-229.
- Engelmann, F. & Takagai, H. (2000). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japan/International Research Center for Agricultural Sciences.
- García, S. (2013). *Determinación de parámetros técnicos para elaborar colado de plátano *Musa alinsanaya* (plátano pildorita) para consumo humano* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana]. Repositorio UNAPIquitos-Institucional. <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/1931>
- Gibert, O., Dufour, D., Giraldo, A., Sánchez, T., Reyes, M., Pain, J., González, A., Fernández, A. y Díaz, A. (2009). Differentiation between Cooking Bananas and Dessert Bananas. 1. Morphological and Compositional Characterization of Cultivated Colombian Musaceae (*Musa* sp.) in Relation to Consumer Preferences. *Química agrícola y alimentaria*, 57(17), 7857–7869.
- González, J. (2004). *Transformación genética del plátano (*Musa* sp, cv, “Hartón”) mediante *Agrobacterium tumefaciens** [Tesis Doctoral., Universidad Central de Venezuela].
- Hernández, I., Martínez, M., Contreras, R. y Pérez, R. (2017). Extracción de almidón por el método seco en plátano macho, cuadrado y castilla. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 4(13), 1-7.

- Jesus, S., Silveira, M., Matsura, F. y Cardozo, R. (2007). Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. *Bragantia*, 63(3), 315-323.
- Lucas-Aguirre, J.C., Velásquez-Herrera, J.D. y Quintero-Castaño, V.D. (2016). Caracterización 42 térmica y composicional de harinas extraídas de 30 variedades de musáceas como alternativas en la industria agroalimentaria. *Vitae*, 23(1), 545-550.
- Maldonado, R., Pacheco, E., Díaz, D. & López, I. (2000). *Valor nutricional de las musáceas y uso en la tecnología de alimentos. Memorias: Primer Seminario Venezolano de Plantas Agámicas Tropicales*. Universidad Central de Venezuela. pp. 172-186.
- Martínez-Cardozo, C., Cayón-Salinas, G. y Ligarreto-Moreno, G. (2016). Composición química y distribución de materia seca del fruto en genótipos de plátano y banano. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(2), 217-227.
- Mejía, G. (2018). *Guía técnica del cultivo de plátano*. CENTA, El Salvador. 26 p.
- Millán, L. & Ciro, H. (2012). *Caracterización mecánica y físico-química del banano tipo exportación (Cavendish-Valery)*. Corporación Universitaria Lasallista. <http://hdl.handle.net/10567/136>
- Moline, M. y Zendell, S. (2000). Evaluating and managing premenstrual syndrome. *Medicina General*, 5(2), 1-16.
- Karamura, D., Karamura, E. y Blomme, G. (2011). General Plant Morphology of Musa. En M. Pillay & A. Tenkouano (eds.), *Banana breeding progress and challenges* (1-20). CRC Press
- Moreiras, O., Angeles, C., Cabrera, L. y Cuadrado, C. (2013). *Tablas de composición de alimentos*. Pirámide.
- Kumar, P., Bhowmik, D., Duraivel, S. y Umadevi, M. (2012). Traditional and Medicinal Uses of Banana. *Revista de Farmacognosia y Fitoquímica*, 1(3), 51-63.
- Mota, R., Lajolo, F. y Cordenunsi, B. (2000). Composition and Functional Properties of Banana Flour from Different Varieties. *Almidón*, 52(3), 63-68.
- Nakasone, Y. & Paull, E. (1999). *Tropical fruits, Banana*. Wallingford. UK/New York, USA: CABI Publishing. pp. 103-131.

- Offem, J. & Thomas, O. (1993). Chemical changes in relation to mode and degree of maturation of plantain (*Musa paradisiaca*) and banana (*Musa Sapientum*) fruits. *Investigación alimentaria internacional*, 26, 187-193.
- Ovando, M., Agama, E., & Bello, A., (2007). *Digestibilidad in vitro del almidón en espagueti adicionado con almidón de plátano*. Memorias IX congreso de ciencia de los alimentos y V foro de ciencia y tecnología de alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, México. pp. 71-77.
- Paiva, C., Fioravanço, C. y Mainca, I. (1997). Caracterização química dos frutos de quatro cultivares e duas seleções de goiabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 19(1), 57-63.
- Chitarra, I. y Chitarra, B. (1990). *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: ESAL-FAEPE. 320 p.
- Quiceno, M., Giraldo, G. & Villamizar, R. (2014). Caracterización fisicoquímica del plátano (*Musa paradisiaca* sp. AAB, Simmonds) para la industrialización. *UG Ciencia*, 20(1), 48-54.
- Rabbani, G., Larson, C., Islam, R., Sasha, U. & Kabir, A. (2010). Green banana-supplemented diet in the home management of acute and prolonged diarrhoea in children: a community-based trial in rural Bangladesh. *Medicina Tropical y Salud Internacional*. 15,(10), 1132-9.
- Ramírez, M. (2008). Redes de recursos fitogenéticos en las Américas. *Recursos Naturales y Ambiente*, 53, 85-92.
- Rodríguez, N. & Rodríguez, A. (2000). El cultivo del plátano (*Musa* spp.) en la Agricultura Urbana de la República de Cuba. En: *Seminario Taller: Organóponicos y la Producción de Alimentos en la Agricultura Urbana* (pp. 31-37). FIDA/MINAGRI/CIARA.
- Rosales-Reynoso, O.L., Agama-Acevedo, E., Aguirre-Cruz, A., Bello-Perez, L.A., Dufour, D. & Gibert, O. (2014). Evaluación fisicoquímica de variedades de plátanos (*Musa* sp.) de cocción y postre. *Agrociencia*, 48(4), 387-401.
- Salvador, A., Sanz, T., & Fiszman, S. (2007). Changes in colour and texture and their relationship with eating quality during storage

- of two different dessert bananas. *Biología y tecnología poscosecha*, 43 (3), 319-325.
- Smith, J., Tucker, A. y Jeger, J. (1989). Softening and cell wall changes in bananas and plantains. *Aspectos de la biología aplicada*, 20, 57-65.
- Soto, M. (1985). *Bananos: cultivo y comercialización*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 627 p.
- Stover, H. Simmonds, N. (1987). *Bananas*. Longman Scientific & Technical. 468 p.
- The Alliance of Bioversity International and CIAT. (2015). *Bioversity*. Obtenido de: <http://www.bioversityinternational.org/researchportfolio/conservation-use-of-bananas-tree-crops/banana/>. Fecha de consulta: 16/05/2022.
- Valerio-Dávila, F. (2014). Determinación de los parámetros para la extracción de almidón del plátano Bellaco (*Musa paradisiaca*). *Revista de Investigación Universitaria*, 3(2), 23-28.
- Vázquez-Castrejón, R., Romero-Cadena, A. y Figueroa-Viera, J. (2005). *Paquete tecnológico para el cultivo de plátano*. Gobierno del Estado de Colima.
- Von Loesecke, H. (1989). *Bananas: chemistry, physiology, technology*. 2a edición. Interscience publishers.

DIVERSIDAD GENÉTICA Y SUS IMPLICACIONES EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.)

Ana Cruz Morillo Coronado^{1*}, Elsa Helena Manjarres Hernández² y
Yacenia Morillo Coronado³

RESUMEN

La quinua es una especie andina, con un gran valor nutricional, alta capacidad de adaptación agroecológica, con metabolitos secundarios de interés y una amplia diversidad genética. A pesar de su potencial genético y de producción en Colombia, son escasos sus estudios genéticos, ya que no se cuenta con programas de mejoramiento o procesos de selección que lleven a la obtención de variedades comerciales. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la diversidad genética de la quinua colombiana, a partir de 90 genotipos de quinua, usando 27 marcadores microsatélites. Se obtuvieron, en promedio, 5.33 alelos para un total de 144. El Contenido de Información Polimórfico (PIC) mostró que todos los microsatélites evaluados fueron altamente informativos, siendo QAAT100 (0.80), QAAT112 (0.78), QAAT076 (0.78) y QCA088 (0.77), los más informativos. Los genotipos evaluados mostraron una alta variabilidad genética con una heterocigosidad promedio de 0.69. Los análisis de estructura poblacional conformaron tres grupos (Grupo A, Grupo B y Grupo C), con distancias genéticas menores a 0.33. Los agrupamientos no se correspondieron con el sitio geográfico de procedencia de los genotipos evaluados. Se encontró una baja diferenciación genética en los grupos estudiados, lo cual puede ser debido al sistema de reproducción de la especie, el

¹ Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Av. Central Norte 39-115, Tunja, Colombia. *ana.morillo@uptc.edu.co

² Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad Ciencias Biológicas, Av. Central Norte 39-115, Tunja, Colombia.

³ Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Carrera 32 N° 12-00, Palmira, Colombia.

alto porcentaje de polinización cruzada, el intercambio constante de semilla entre los agricultores, la falta de material de siembra certificado, los procesos de coevolución y selección a la que está sometida la especie en su entorno natural, entre otros factores, los cuales están influenciando de una u otra manera la diversidad genética en las zonas productoras de la región andina. Este estudio constituye una primera aproximación hacia el conocimiento del germoplasma de la quinua y que servirá de base para el planteamiento de estrategias de conservación y mejoramiento genético de la especie.

PALABRAS CLAVE

Chenopodium quinoa, diversidad genética, germoplasma, mejoramiento genético.

Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una especie dicotiledónea anual de la familia Amarantaceae distribuida en Suramérica a lo largo de los Andes, donde es cultivada en diferentes regiones, especialmente, en países como Colombia, Chile, Bolivia, Ecuador y Perú (Jaikishun *et al.*, 2019). La quinua tiene un alto perfil nutricional con 10 a 18 % de proteínas de semilla y 4.1 a 8.8 % de grasas (Song & Tang, 2023). Toda la planta se puede utilizar como alimento tanto para humanos como para animales. El grano de quinua es rico en todos los aminoácidos, vitaminas (A, E, B2), carbohidratos, minerales (K, Fe, Ca, Mn) y ácidos grasos de apoyo saludables (Omega-3) (Song & Tang, 2023) y se utiliza para fines industriales (Garziano *et al.*, 2022). Presenta una gran adaptación agroclimatológica en ambientes poco favorables para otros cultivos (Saddiq *et al.*, 2021).

Los estudios de diversidad genética pueden brindar información útil para los programas de mejoramiento y conservación de germoplasma de la quinua (El-Harty *et al.*, 2021). Esta hierba se puede cuantificar utilizando marcadores moleculares como los microsatélites, los cuales se han convertido en una herramienta valiosa para la caracterización de germoplasma debido a que son altamente polimórficos,

reproducibles, multialélicos, codominantes y distribución amplia y uniforme en el genoma (Wang *et al.*, 2019). Estudios de caracterización molecular del germoplasma de quinua, usando microsatélites, han mostrado una alta diversidad genética, demostrando así el alto poder discriminatorio de este tipo de marcadores (Morillo *et al.*, 2020; Salazar *et al.*, 2019).

En Colombia existen pocos estudios de diversidad genética en quinua y la evidencia molecular sugiere que los genotipos colombianos presentan una alta variabilidad genética a nivel intraespecífico (Morillo *et al.*, 2020). Esta alta diversidad genética puede ser explicada por el sistema reproductivo de la quinua, la cual es considerada predominantemente autógena, con un alto porcentaje de polinización cruzada, donde los procesos de coevolución con el ambiente y la selección direccionada han generado cruces a nivel inter e intraespecífico (Manjarres & Morillo, 2022). El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad genética de la quinua colombiana con miras al establecimiento de estrategias de conservación y mejoramiento genético de esta especie.

Metodología

Material Vegetal

Se utilizaron 30 genotipos seleccionados, a partir de un estudio de caracterización morfoagronómica (Manjarres *et al.*, 2021) y un genotipo de Amaranto como referencia, con nueve repeticiones cada uno (Tabla 1). La caracterización molecular se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular y Celular Vegetal de la UPTC.

Tabla 1. Sitio de procedencia de los genotipos utilizados para la caracterización molecular con los marcadores microsatélites (SSR)

	Genotipos	Localización	Coordenadas
1	<i>Quinoa Real</i>	Ventaquemada	5°22'00.4"N 73°31'16.9"W
2	<i>Quinoa Aurora</i>	Soracá	5°30'06.9"N 73°20'00.5"W
3	<i>Quinoa Ceniza</i>	La colorada Tunja	5°34'44.7"N 73°20'36.0"W
4	<i>Quinoa Beteitiva</i>	Beteitiva	5°54'39.1"N 72°48'31.2"W

Diversidad genética y sus implicaciones en el mejoramiento genético de la quinua...

5	<i>Quinoa Sotaquirá</i>	Sotaquirá. Vereda Bociga	5°45'57.6"N 73°14'52.2"W
6	<i>Quinoa Negra</i>	La colorada Tunja	5°34'44.7"N 73°20'36.0"W
7	<i>Tunkahuan ICA</i>	ICA Surbatá	5°47'45.5"N 73°04'20.2"W
8	<i>Blanca de Jericó Tuta</i>	Tuta	5°41'26.6"N 73°13'39.1"W
9	<i>Amarilla de Marangani</i>	Pasca	4°18'32.8"N 74°17'59.6"W
10	<i>Quinoa colorada</i>	La colorada Tunja	5°34'44.7"N 73°20'36.0"W
11	<i>Blanca dulce de Soracá</i>	Soracá	5°30'06.9"N 73°20'00.5"W
12	<i>Piartal Chocontá</i>	Chocontá	5°08'44.3"N 73°41'07.0"W
13	<i>Quinoa dulce de Tuta</i>	Tuta	5°41'26.6"N 73°13'39.1"W
14	<i>Quinoa Semiamarga</i>	Duitama	5°49'36.3"N 73°02'03.9"W
15	<i>Quinoa Peruna</i>	Cómbita	5°38'01.9"N 73°19'28.4"W
16	<i>Quinoa Siachoque</i>	Siachoque	5°30'45.3"N 73°14'44.3"W
17	<i>Blanca de Jericó Tuta2</i>	Tuta	5°41'26.6"N 73°13'39.1"W
18	<i>Piartal Tibasosa</i>	Tibasosa	5°44'40"N 73°14'16"W
19	<i>Blanca de Jericó Tunja</i>	Tunja	5°31'4"N 73°23'48"W
20	<i>Blanca de Jericó Toca</i>	Toca-Vda Tuaneca	5°34'03.6"N 73°11'24.2"W
21	<i>Creмосa Malvinas</i>	Siachoque	5°31'00.8"N 73°14'59.7"W
22	<i>Tunkahuan Tibasosa</i>	Tibasosa	5°44'40"N 73°14'16"W
23	<i>Tunkahuan Siachoque</i>	Siachoque-Finca San Antonio	5°31'55.6"N 73°16'10.6"W
24	<i>Mezcla Siachoque 1</i>	Siachoque	5°31'00.8"N 73°14'59.7"W
25	<i>Mezcla Siachoque 2</i>	Siachoque	5°31'00.8"N 73°14'59.7"W
26	<i>Mezcla Siachoque 3</i>	Siachoque	5°31'00.8"N 73°14'59.7"W
27	<i>Quinoa Primavera</i>	Siachoque-Sabana de Bogotá	4°24'56.3"N 74°06'06.0"W
28	<i>Quinoa Galindo</i>	Cómbita	5°38'01.9"N 73°19'28.4"W
29	<i>Col-quinua</i>	Cómbita	5°38'01.9"N 73°19'28.4"W
30	<i>Susunaga</i>	Cómbita	5°38'01.9"N 73°19'28.4"W
31	<i>Amaranthus sp</i>	Tunja	5°31'4"N 73°23'48"W

Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN se colectaron entre tres a cuatro hojas jóvenes de cada genotipo y se utilizó el protocolo de Dellaporta, modificado por Muñoz *et al.* (2008). El ADN total se visualizó en geles de agarosa al 0.8% en una cámara de electroforesis Maxicell Primo

EC-340. Se determinó la concentración por espectrofotometría en un equipo EPOCH|2 de Biotek, posteriormente se realizó su dilución usando agua HPLC para un volumen total de 100 μL a 10 ng / μL , almacenado a -20°C .

Amplificación de los marcadores microsatélites

Se seleccionaron 27 microsatélites que mostraron ser altamente polimórficos (Christensen *et al.*, 2007; Jarvis *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2005) (Tabla 2). La reacción de amplificación de los SSRs se preparó en un volumen final de 25 μL . La mezcla de reacción incluía tampón 1X, MgCl_2 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, polimerasa Taq 1U, cebador 2 μM y 10 ng de ADN genómico. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de controlador térmico programable PTC 100 (M.J. Research, Inc.). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 95°C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, para la hibridación las temperaturas dependieron de los primeros empleados (Tabla 2), y extensión a 72°C durante 1.5 min. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa de alta resolución al 2.5% a 200 voltios durante dos horas en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electroforesis Gel System y se tiñeron con Z-Vision.

Análisis de la información

El patrón de bandas generado por los genotipos evaluados con los 27 microsatélites se registró en una matriz donde fueron asignados para cada uno de los alelos encontrados por locus, y a cada genotipo un máximo de dos valores por locus dependiendo si era homocigoto o heterocigoto. El dendrograma se construyó con el Programa TREE de NTSYS-pc (NTSYS-pc Numerical Taxonomy System for Personal Computer) y se calculó el coeficiente de correlación cofenética (Programas COPH y MXCOMP del NTSYS-pc). Se estimaron los parámetros de diversidad genética, número de alelos por locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e), la heterocigosidad esperada (H_e)

y observada (H_o) por locus, índice de Contenido de Información Polimórfica (PIC) y los índices de fijación (F) usando los programas POPGENE, GenAlex 6.5 y Microsatellite Tool Kit.

Para determinar la estructura poblacional se usó el método de agrupamiento bayesiano con el programa Structure versión 2.34 (Pritchard *et al.*, 2000). Se empleó un modelo mixto de frecuencias alélicas correlacionadas evaluando entre 1 y 7 subpoblaciones (K) con 10 repeticiones y por cada número de grupos permitidos en el análisis (K), 100.000 iteraciones burn-in y 1.000.000 pasos de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). A los subgrupos conformados se les estimó los parámetros genéticos mencionados anteriormente. Se realizó el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con el programa GenAlex 6.5.

Resultados y discusión

Los 31 genotipos evaluados en este estudio usando 27 marcadores microsatélites, resultaron ser altamente informativos y generaron 144 alelos, con una media de alelo por locus de 5.33. El marcador QGA002 ($A=8$) fue el que mostró un mayor número de alelos, en tanto que el KCAA106 sólo obtuvo dos alelos. El número efectivo de alelos osciló entre 2 (KCAA106) y 6.62 (QAAT100). Por otra parte, el contenido de información polimórfico (PIC) mostró que los microsatélites más informativos fueron el QAAT100, QAAT112, QAAT076, QCA088 y QAAT74 con valores entre 0.80 y 0.76. El marcador QAAT106 hizo la mayor contribución a la variación observada con un F_{st} de 0.45. La heterocigosidad total observada fue de 0.54, con valores que oscilaron entre 0 y 1. Mientras la heterocigosidad esperada varió entre 0.50 y 0.85 con una media de 0.69 (Tabla 2).

Tabla 2. Microsatélites utilizados para la genotipificación de las accesiones de quinua evaluadas

Identity	Primer Forward	Primer Reverse	Annealing temp. (°C)	Na	Nc	Ho	He	I	PIC	Fst
KG-A03	atggcgcacatgaacgaat	gctctatgtaaatgtcgatgcccac	58	7	3.98	0.86	0.75	1.53	0.70	0.03
QAAAT100	ggcatccagggcagctt	gcaattctctcaataacaacaca	53	7	6.62	0.28	0.85	1.92	0.80	0.08
QAAAT106	tcagtaagataataccatcagaaag	aaaatcccctctatatacaca	56	5	3.53	0.00	0.72	1.43	0.60	0.46
QGA002	gctctgaaccttaataggctgtaacaaic	aagaaatgctcaagaaga	55	8	3.09	0.47	0.68	1.47	0.63	0.05
QAAAT150	ggcagcgcgtactacata	atggcgaatggfnaattggc	53	6	4.10	0.68	0.76	1.54	0.70	0.08
QAAAT174	gctctatggaaacacccatcccgataa	atgccatctctatctccca	56	6	4.91	0.45	0.80	1.63	0.76	0.08
QAAAT112	ccgatccaccataagagaa	tgaangtgaagatggagaaatgaca	58	7	5.37	0.93	0.82	1.76	0.78	0.13
QAAAT022	tggctgataatgatcaacaaa	ggagcccagatgtractca	58	6	4.60	0.50	0.79	1.62	0.73	0.17
QAAAT076	gcttcaatgftaataatggcaat	tcctggctcccactaattt	54	7	5.35	0.96	0.82	1.75	0.78	0.02
KG-A016	cccgtctaatctccgfgaa	ccgaaccaagactacgaacaa	53	4	2.66	0.00	0.63	1.10	0.52	0.28
QCA48	gctctcaatacatataaccacaaatfcaa	tggaaatgctactatgattgga	55	5	3.91	0.56	0.75	1.44	0.68	0.10
KG-A020	gctctcaccctaccctgtaaggaaa	ggagcagatgtaacatgg	58	6	4.38	0.60	0.78	1.60	0.70	0.04
QCA057	gctctgcaaggaaaccatcttgg	tgcctcacgctcacctaca	58	6	4.43	0.35	0.78	1.59	0.72	0.22
QCA088	gctctctggctgctccacctaat	cagctccgaatcgtaactc	53	7	5.42	0.61	0.82	1.78	0.77	0.10
QAAAT178	agcgaagaaatgggaact	gctcttcaacgatagctcccaaggaa	53	4	3.05	0.52	0.68	1.17	0.58	0.25
KAAAT007	agatacagcggcgaagatc	cggtagctatagcacaagaag	55	5	3.61	0.53	0.73	1.40	0.65	0.10
KCA-A106	aatgggaatggcccaag	gcatgctcatcttggc	58	2	2.00	1.00	0.50	0.69	0.38	0.00
KG-A120	ttagcaiccgatagcc	tgaaccacatgacaag	56	3	2.04	0.97	0.51	0.74	0.39	0.00
QGA032	ggfgaatgcaatgccaag	tggcagttggatccaciataaa	53	5	2.62	0.57	0.62	1.14	0.48	0.03
QCA096	ccaatgtaatgctgctctc	ctgctggcgttaagctgg	53	3	2.27	0.00	0.56	0.92	0.36	0.34
QATG019	ccaacaagacataaaggaaacc	cgaaggtgaaggagatcca	58	5	2.57	0.90	0.61	1.11	0.54	0.04
QCA005	gtgftcagctgctgatcctt	ctggcatcagggcctatct	58	5	2.93	0.00	0.66	1.23	0.49	0.05
QAAAT051	ctctgacaaggctccatia	cgctcatagfaggagcattt	53	5	2.36	0.61	0.58	1.13	0.50	0.01
QAAAT088	tcnaactctctgctatctctt	ccaegatcccaagacattt	53	5	2.78	0.23	0.64	1.26	0.55	0.01
QAAAT027	aatgaggagcaatgcaaaag	cggtctctccactcaatttct	56	3	2.33	0.81	0.57	0.92	0.37	0.01
KAAAT006	tcgcaagatcggaacctt	tgtatctcgtgctccact	53	7	3.65	0.33	0.73	1.52	0.63	0.34
QGA021	caagaaaccaactctctca	caccacaaatcacaccttg	53	5	2.60	0.77	0.62	1.22	0.53	0.03
		Promedio		5.33	3.60	0.54	0.69	1.35	0.60	0.11
		DE		1.49	1.22	0.31	0.10	0.32	0.14	0.12

Na: Número de alelos por locus, Nc: Número de alelos efectivos por locus, Ho: Heterogeneidad observada, He: Heterogeneidad esperada, I: Índice de información de Shannon, PIC Contenido de Información Polimórfica, Fst coeficiente de diferenciación genética.

Los resultados encontrados en este estudio evidencian que la quinua colombiana presenta una alta diversidad genética, (Morillo *et al.*, 2022). La riqueza alélica ($N_a = 144$, media = 5.33 alelos / locus) y heterocigosidad genética ($H_e = 0,69$) detectada para los genotipos evaluados fue comparable con los reportado en otros países, quienes, estudiando la diversidad genética de la quinua con microsatélites, obtuvieron altos porcentajes de loci polimórficos y altos valores de heterocigosidad (Romero *et al.*, 2019; Salazar *et al.*, 2019). Para todos los microsatélites se encontró un tamaño de los alelos similar a lo registrado en otros estudios de diversidad (Fuentes *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2008), además, se determinó que QAAT100, QAAT112, QAAT076 y KCAA106 pueden ser útiles para la diferenciación de *Chenopodium*, al tener coeficientes de diferenciación genética significativos (Morillo *et al.*, 2020).

Investigaciones realizadas en los ecotipos de quinua de la región andina han mostrado que los genotipos procedentes del altiplano tienden a tener mayores valores de heterocigosidad (mayor al 70%) que los otros ecotipos (Costa, 2014). En Ecuador, Salazar *et al.* (2019), usando 15 microsatélites en 84 accesiones, encontraron una heterocigosidad promedio de 0.71, concluyendo que estas son muy diversas, resultados similares a lo encontrado en la evaluación del germoplasma de quinua colombiana (Manjarres & Morillo, 2022). Los estudios de caracterización molecular encaminados hacia la determinación de la diversidad genética del germoplasma de quinua han mostrado diferencias en las heterocigosidades, lo cual puede deberse al tamaño y la distribución geográfica de los genotipos evaluados, la elección del marcador, el sistema de apareamiento o reproducción de la especie, porcentaje de polinización cruzada (8 al 10%) y el proceso de coevolución y selección que ha sufrido la especie en su entorno natural (Christensen *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2019).

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li a un nivel de similitud de 0.48 diferenció a los genotipos de quinua en tres grupos y el grupo de referencia (amaranto) (Figura 1). En el grupo I se encuentran las quinuas que se caracterizaron por presentar distancias genéticas entre 0.58 a 0.96; sin embargo, es un grupo diverso a nivel de carac-

terísticas fenotípicas como el color de las semillas (Manjarres *et al.*, 2021). El grupo II está representado por 15 genotipos, con distancias genéticas entre 0.53 y 0.94, e incluye materiales amargos como *Amarilla de Maranganí* y *Quinua colorada*. Mientras el grupo III contiene 42 genotipos y muestra una alta diversidad con distancias genéticas superiores a 0.50. El análisis de estructura poblacional mostró un delta K igual a 3 (Grupo A, Grupo B y Grupo C), lo cual sugiere la presencia de tres poblaciones principales (Figura 2a), las cuales no se conformaron por el lugar de procedencia de los genotipos (Figura 2b). Lo que demuestra que la diversidad genética del germoplasma de quinua colombiano no tiene un patrón geográfico determinado y que existen otras fuerzas evolutivas que gobiernan su diversidad.

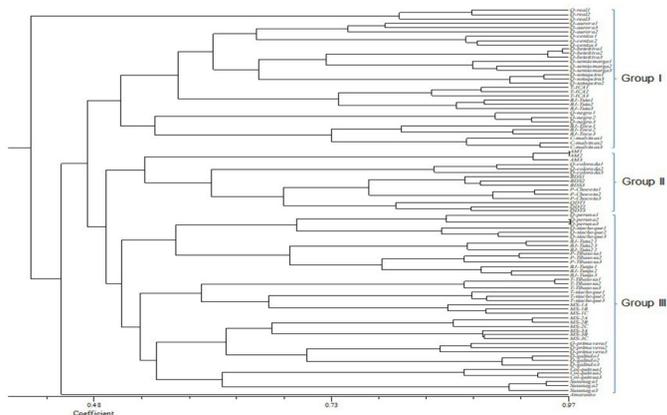


Figura 1. Dendrograma de las accesiones de quinua basado en el coeficiente de similitud Nei-Li y calculado con veintisiete marcadores SSR con el método de clasificación UPGMA, SAHN y TREE de NTSYS-pc versión 1.8 (Exeter Software, NY, USA)

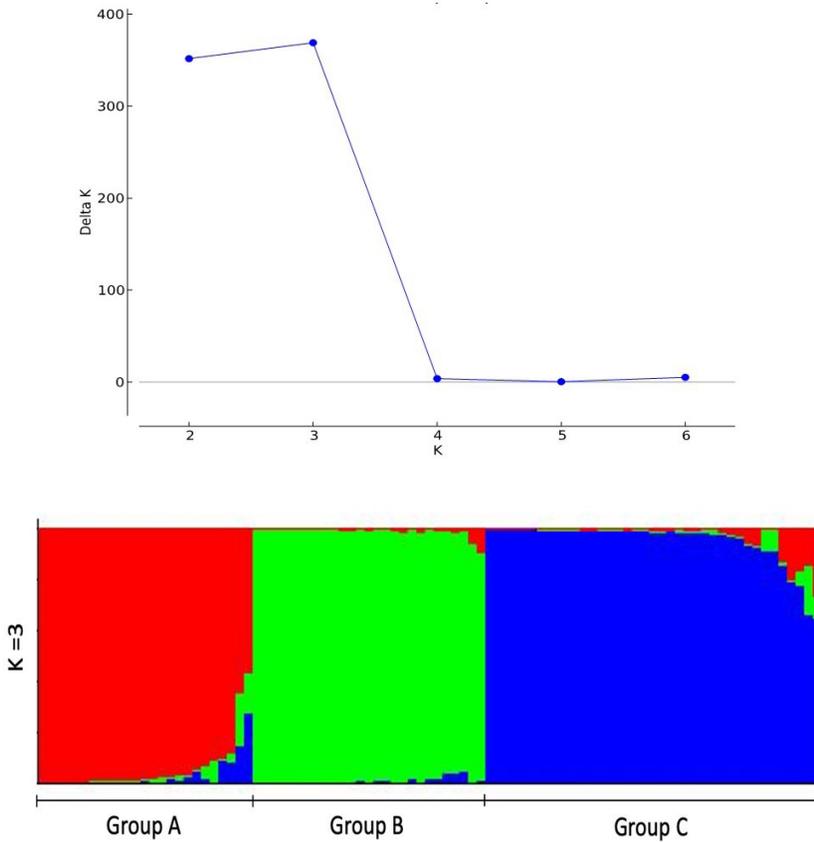


Figura 2. Estructura poblacional de 91 accesiones de *C. quinua* a. Método de Evanno con un modelo óptimo de $K = 3$. b. Agrupación de las accesiones de quinua colombiana (Grupos A, B y C). Cada barra vertical representa una muestra individual y el color de la barra indica la probabilidad de que un individuo sea asignado a uno de los grupos identificados

La heterocigosidad esperada fue alta para los tres grupos, con un índice de diversidad más alto para el grupo B ($He = 0.62$), seguido del grupo A ($He = 0.58$) y, finalmente, el grupo C con He de 0.56. El porcentaje de loci polimórficos fue superior al 95%. Los índices de fijación en las tres poblaciones son menores a 0.14, lo que evidencia que no hay diferenciación entre la población general y las subpobla-

ciones. El mayor número de alelos privados lo tiene el grupo B con 7 alelos privados, lo que indica una mayor diversidad alélica de esta población, contrario al grupo C que sólo presentó un solo alelo. Las comparaciones por pares del coeficiente de Nei demostraron que los tres grupos se encuentran interrelacionados significativamente entre sí (Tabla 3). Así, mientras que los grupos A y B aparecieron más relacionados ($NeiDST = 0.24$), los grupos A y C presentan una distancia genética de 0.33 (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética para los tres subgrupos poblacionales conformados por los análisis de agrupamiento

	Grupo A(n= 25)	Grupo B(n= 39)	Grupo C (n= 27)
<i>Allelic diversity</i>			
Mean Na	3.81	3.89	3.52
Private alleles	5	7	1
Shannon's Information Index	1.04	1.12	0.99
% of Polymorphic Loci	100%	100%	96.30%
Fixation Index	0.14	0.04	0.05
Expected heterozygosity	0.58	0.62	0.56
<i>Pairwise genetic distance comparisons among subgroups (NeiDST)</i>			
Grupo A	****	0.24	0.33
Grupo B	0.24	****	0.32
Grupo C	0.33	0.32	****

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación genética se encuentra de acuerdo con las diferencias observadas dentro de las poblaciones (81%). En comparación, la variabilidad entre poblaciones fue del 19% y la diferenciación poblacional fue significativa ($\Phi_{PT} = 0.18$, $p < 0.001$).

Tabla 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) y resultado de diferenciación poblacional (Φ_{PT}) para poblaciones de quinua obtenidos mediante análisis de alelos SRAP

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	Varianza Estimada	%
Entre Grupo	2	125.87	62.94	1.85	19%

Dentro de Individuos	88	713.98	8.11	8.11	81%
Total	90	839.86		9.96	100%
PhiPT	0.18	$p < 0.001$			

Los análisis de estructura poblacional del germoplasma de quinua colombiano mostraron tres grupos poblacionales que presentan diversos grados de intercambio genético entre ellos, lo que sugiere que la diversidad observada es generada probablemente por el intercambio de semillas entre los agricultores, práctica muy común y que ha sido documentada frecuentemente para el establecimiento de los cultivos de quinua en Colombia (Morillo *et al.*, 2022; Salazar *et al.*, 2019).

Conclusiones

La evaluación de 90 genotipos de quinua con marcadores microsátélites permitió identificar una alta diversidad genética, propia de la especie influenciada por el constante intercambio de semillas entre los agricultores, modo de reproducción, procesos antropogénicos y la constante coevolución con el ambiente, que constituyen una base genética sólida sobre la cual se pueda mejorar la producción y comercialización de la quinua en Colombia.

Agradecimientos

Al Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación Francisco José de Caldas-Min-Ciencias. Cód.63924. Grupo de investigación CIDE (Competitividad, Innovación y Desarrollo Empresarial) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Referencias

- Christensen, S.A., Pratt, D.B., Pratt, C., Nelson, P.T., Stevens, M.R., Jellen, E.N., Coleman, C.E., Fairbanks, D.J., Bonifacio, A., & Maughan, P.J. (2007). Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genet Resour*, 5(2), 82–95. <https://doi.org/10.1017/S1479262107672293>
- Costa, S. (2014). *Variabilidad genética de Chenopodium quinoa Willd en el Noroeste Argentino y su relación con la dispersión de la especie* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de la Plata].
- El-Harty, E.H., Ghazy, A., Alateeq, T.K., Al-Faifi, S.A., Khan, M.A., Afzal, M., Alghamdi, S.S., & Migdadi, H.M. (2021). Morphological and molecular characterization of quinoa genotypes. *Agriculture*, 11, 286. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040286>
- Fuentes, F., Maughan, P.J., & Jellen, E.R. (2009). Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Rev Geogr Valpsol*, 42, 20–33.
- García, M., Zurita, A., Stechauner, R., Roa, D., & Jacobsen, S.E. (2020a). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its relationship with agroclimatic characteristics: a colombian perspective. *Chilean journal of agricultural research*, 80(2), 290-302. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000200290>
- Garziano, S., Agrimonti, C., Marmiroli, N., & Gullí, M. (2022). Utilisation and limitations of pseudocereals (quinoa, amaranth, and buckwheat) in food production: A review. *Trends in Food Sci & Tech*, 125, 154-165. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.007>
- Jaikishun, S., Li, W., Yang, Z., & Song, S. (2019) Quinoa: in perspective of global challenges. *Agronomy*, 9(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040176>
- Jarvis, D.E., Kopp, O.R., Jellen, E.N., Mallory, M.A., Pattee, J., Bonifacio, A., Coleman, C.E., Stevens, M.R., Fairbanks, D.J., & Maughan, P.J. (2008). Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Genetics*, 87(1), 39–51. <https://doi.org/10.1007/s12041-0080006-6>

- Manjarres, E.H., Morillo, A.C., Ojeda, Z.Z., Cárdenas, A., & Arias, D.M. (2021). Characterization of the yield components and selection of materials for breeding programs of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Euphytica*, 217(6), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02837-5>
- Manjarres, E.H., & Morillo, A.C. (2022). Genetic diversity of Colombian quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): implications for breeding programs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(7), 2447–2458. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01383-w>
- Mason, S.L., Stevens, M.R., Jellen, E.N., Bonifacio, A., Fairbanks, D.J., Coleman, C.E., McCarty, R.R., Rasmussen, A.G., & Maughan, P.J. (2005). Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science*, 45(4), 1618–1630. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0295>
- Morillo, A.C., Manjarres, E.H., Reyes, W.L., & Morillo, Y. (2020). Molecular characterization of intrapopulation genetic diversity in *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae). *Genetics and Molecular Research*, 19(4), 1–13. <https://doi.org/10.4238/gmr18667>
- Morillo, A.C., Manjarres, E.H., Morillo, Y. (2022). Phenotypic diversity of agromorphological characteristics of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm in Colombia. *Scientia Agrícola*, 79(4), 1–6. <http://doi.org/10.1590/1678-992X-2021-0017>
- Muñoz, J.E., Morillo, A., & Morillo, Y. (2008). Random Amplified Microsatellite (RAMs) in studies of plant genetic diversity. *Acta Agronómica*, 57, 219–226.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959
- Romero, M., Mujica, A., Pineda, E., Camapaza, Y., & Zavalla, N. (2019). Genetic identity based on simple sequence repeat (SSR) markers for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Ciencia e investigación agraria*, 46(2), 166–178. <https://dx.doi.org/10.7764/rcia.v45i2.2144>
- Saddiq, M.S., Wang, X., Iqbal, S., Hafeez, M.B., Khan, S., Raza, A., Iqbal, J., Maqbool, M.M., Fiaz, S., & Qazi, M.A. (2021). Effect of

- water stress on grain yield and physiological characters of quinoa genotypes. *Agronomy*, 11(10),1934. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101934>
- Salazar, J., De Lourdes, M., Gutierrez, B., & Torres, A.F. (2019), Molecular characterization of Ecuadorian quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) diversity: implications for conservation and breeding. *Euphytica*, 215, 60. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2371-z>
- Song, J., & Tang, Y. (2023). Effect of extrusion temperature on characteristics amino acids, fatty acids, organic acids, and phenolics of white quinoa based on metabolomics. *Food Res InterFood Research International*, 169,112761. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112761>
- Tang, Q., Roos, Y., & Miao, S. (2023). Plant protein versus dairy proteins: A pH-dependency investigation on their structure and functional properties. *Foods*, 12(2), 368. <https://doi.org/10.3390/foods12020368>
- Wang MX, Wu XT, Zou JW, Zhang J, Wang XY, Chang X, Song WN, Nie XJ (2019) Genome-wide microsatellite characterization and marker development in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Applied Biology*, 175(3), 415–423. <https://doi.org/10.1111/aab.12545>

CULTIVO DE TEJIDOS: UNA HERRAMIENTA VALIOSA EN LA CONSERVACIÓN, DISTRIBUCIÓN E INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

Janneth P. Gutiérrez A.^{1*}, Carlos A. Ordoñez¹, Adriana Vásquez H.¹, Teresa Cuasialpud¹, Germán Patiño¹, Daniel Encarnación¹, Adriana Bohórquez Chau¹, Xiaofei Zhang¹ y Jonathan Newby²

RESUMEN

La biotecnología vegetal ofrece un amplio espectro de oportunidades que pueden ayudar a la yuca (cassava) a convertirse en un cultivo mejor para un mundo en constante cambio, la producción masiva de plantas sanas (libres de patógenos) en un medio de cultivo que promueva la propagación vegetativa mediante cultivo de tejidos es una de ellas.

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Genética de Yuca resguarda más de 3 200 genotipos de yuca, que representan cerca de 50 familias desarrolladas a través del tiempo por el Programa de Mejoramiento de Yuca del CIAT. Estas familias están relacionadas con más de 22 rasgos de importancia para el mejoramiento de la yuca. Adicionalmente, nuestra colección conserva genotipos silvestres y materiales del Banco de Semillas del Futuro de la Alianza Bioversity y CIAT, que se utilizan como padres para generar nuevas familias de mejoramiento. Nuestro principal objetivo es proporcionar accesiones de yuca (libres de patógenos) para ser distribuidas a cualquier parte del mundo con propósitos de investigación y/o mejoramiento genético.

PALABRAS CLAVE

Cultivo de Tejidos vegetales, micropropagación, conservación, termoterapia, endurecimiento de vitroplantas.

¹ Alianza de Bioversity y CIAT, Km 17 Recta Cali-Palmira A.A.6713 Palmira, Colombia. * j.gutierrez@cgiar.org

² Asia – Lao PDR Office c/o NAFRI Compound, Ban Nongviengkham Vientiane, Lao PDR.

Introducción

En el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), la micropropagación vegetal ha sido aplicada con éxito para obtener vitroplantas, esta tecnología permite producir, en forma masiva, plántulas libres de enfermedades y patógenos, aumentando así su productividad (Segovia, 2002).

La micropropagación ofrece ventajas con respecto a los métodos convencionales: a) Se trata de un sistema de propagación clonal, es decir, que mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado. b) No se ve afectado por factores ambientales como el clima, sequías, heladas o altas temperaturas debido a que los procesos se realizan en un laboratorio bajo ambientes controlados. c) Se puede obtener un buen número de plantas. d) El espacio que se requiere es mínimo, y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto. e) Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus (Roca, 1991).

Tal como ocurre en otros cultivos, la justificación para la conservación del germoplasma de yuca se fundamenta en: 1. Evitar la pérdida de especies silvestres y cultivadas por problemas de erosión genética y 2. Mantener un alto grado de variabilidad genética para utilizar en los programas de mejoramiento del cultivo (Jaramillo, 2012).

El laboratorio de Cultivo de tejidos de Genética de Yuca del Programa de Yuca de la Alianza Bioersity y CIAT es un punto de apoyo para los diferentes trabajos del área; la micropropagación, toma de tejido foliar para extracción de ADN, conservación, termoterapia y el endurecimiento de vitroplantas en casa de malla son técnicas que han ayudado al establecimiento de poblaciones mejoradas *in vitro* para su fácil distribución, conservación y obtención rápida de clones para evaluar poblaciones en el programa de mejoramiento de yuca y de esta manera compartir con otros países socios.

Trabajamos en la propagación de líneas parentales, que cuentan con características ideales para el programa de mejoramiento; en la conservación de los 3200 genotipos, que conforman nuestra colec-

ción; en la introducción rápida de nuevas variedades y en la limpieza de genotipos valiosos para obtener plantas libres de virus (para lo cual se realiza evaluación de virus de tipo cuarentenario (Carvajal, 2014) como Polerovirus, Potexvirus, Reovirus y Torradovirus, entre otros (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de Patógenos (virus cuarentenarios y fitoplasma) evaluados por el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma de Semillas del Futuro de la Alianza Bioersity y CIAT. Para asegurar la Distribución de material limpio dentro y fuera del País

Patógeno	Nombre en inglés
Polerovirus	Cassava polero-like virus (CsPLV)
Potexvirus	Cassava New alphaflexivirus (CsNAV)
Torradovirus	Cassava torrado-like virus (CsTLV)
Reovirus	Cassava frogskin associated virus (CsFsaV)
Fitoplasma	Phytoplasma
Virus X de la yuca	CsVX
Virus del Mosaico común	Cassava common mosaic virus (CsCMV)

Metodología

En el laboratorio se llevan a cabo diferentes actividades (Figura 1.)

1. Establecimiento de genotipos: Las accesiones de yuca procedentes del campo, del grupo de mejoramiento, se establecen en el invernadero.

2. Limpieza: Las plantas establecidas en el invernadero son ingresadas al laboratorio por medio de siembra de meristemos o micro esquejes. Las plantas obtenidas se limpian mediante la técnica de termoterapia utilizando las puntas de los brotes. El proceso consiste en tres ciclos de 12 días cada uno en incubadoras: fotoperiodo 12 horas de luz a 40 °C, 12 horas de oscuridad a 35 °C con una humedad relativa del 50% (Roca, 1991).



Figura 1. Actividades llevadas a cabo en el laboratorio de Cultivo de tejidos de Genética de yuca

3. Indexación: Cuando los materiales han pasado por el proceso de termoterapia (están limpios), se someten a una prueba de indexación. El método consiste en un análisis molecular para verificar que todos los materiales están libres de virus y fitoplasma, el cual es realizado en el laboratorio de Sanidad de Germoplasma que hace parte de Semillas del Futuro de la Alianza Bioversity y CIAT.

4. Multiplicación y Conservación: Todos los genotipos, después de pasar por el proceso de termoterapia, son propagados y conservados *in vitro*. Los materiales son conservados en un cuarto con condiciones especiales de temperatura e iluminación, por lo que pueden durar hasta un año para su renovación (Mafla, 2010).

5. Endurecimiento: Las puntas apicales de los brotes de los materiales solicitados por los clientes y colaboradores se siembran en medio 17N a 28°C en condiciones controladas durante un mes. A continuación, se llevan al invernadero para su establecimiento (Segovia, 2002).

6. Distribución: Para realizar el envío de materiales solicitados se sigue un protocolo de distribución. Los materiales solicitados se embanan adecuadamente y se envían con acuerdos de confidencialidad

y permisos fitosanitarios. Además, debemos conservar las normas de cada país de destino.

7. Uso Final: Tras el proceso de endurecimiento, las plantas se establecen en el campo para realizar diferentes análisis. Por ejemplo, iniciar otros ciclos de mejoramiento de la yuca para producir híbridos mediante cruces entre materiales prometedores de un rasgo concreto.

8. Preparación de Medios y soluciones stock requeridas para llevar a cabo la propagación del material vegetal en la etapa de multiplicación y conservación del material (Murashige, 1962)

Resultados y discusión

Nos enfocamos en cubrir los requerimientos de material vegetal del programa de yuca para desarrollar actividades en el área de mejoramiento genético, biología molecular y protección de cultivos, para lo cual se multiplican las diferentes familias de interés (Tabla 2). Adicionalmente, se reciben solicitudes de otros grupos de investigación dentro y fuera del país (Figura 2).

En nuestro laboratorio se han procesado más de 14 000 semillas procedentes de cruces controlados e interespecíficos entre progenitores resistentes y padres élite adecuados para las condiciones agroecológicas deseadas.

Tabla 2. Propósitos de Interés de las diferentes familias Conservadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos



¹ CMD: del inglés, Cassava Mosaic Disease (Virus del mosaico de la yuca).

² CBSD: del inglés, Cassava brown streak virus disease (enfermedad del estriado marrón de la yuca).

Cerca de 6 000 genotipos fueron germinados por rescate de embriones y micropropagados para extracción foliar y análisis molecular. Las poblaciones enviadas han tenido un alto impacto económico en diferentes países, han mostrado resultados favorables frente a enfermedades como CMD (del inglés Cassava Mosaic Virus), mosca blanca, entre otros. Adicionalmente, han sido utilizadas como parentales para cruzamiento con variedades locales.

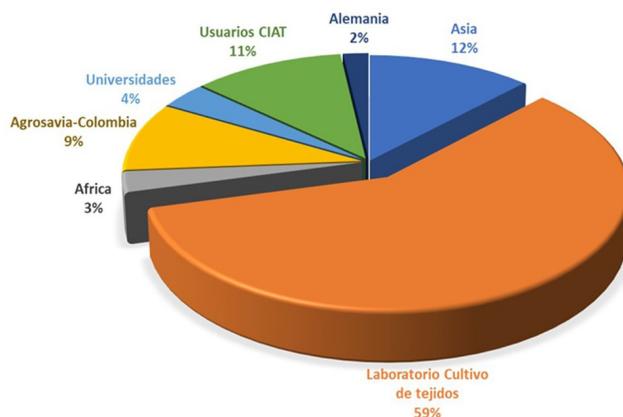


Figura 2. Distribución y Conservación del Germoplasma de yuca durante el año 2022

Hemos enviado con éxito plántulas *in vitro* de 1 660 genotipos relacionados con diferentes rasgos o enfermedades como la resistencia a CMD (familias AR y CR), cuero de sapo, mosca blanca, etc. a diferentes socios (Figura 2). Se han establecido en el laboratorio 294 genotipos a partir de cruces F3 para resistencia a mosca blanca, que actualmente se encuentran en termoterapia para asegurar su limpieza.

Tenemos convenios colaborativos con centros de investigación nacionales y/o Universidades —como es el caso de AGROSAVIA (Corporación colombiana de investigación)— enviando hasta el momento plántulas *in vitro* de doce variedades comerciales (limpias) de yuca para diferentes fines incluidos distribución entre los pequeños agricultores.

Conclusiones

1. El Laboratorio de Cultivo de Tejidos conserva plantas de yuca por largo plazo y las pone a disposición para su distribución.
2. Nuestra colección de germoplasma es un repositorio de biodiversidad que presta apoyo a los mejoradores e investigadores proporcionando material para el desarrollo de diferentes proyectos de investigación.
3. Se logra el mantenimiento anual de las diferentes familias para cubrir los propósitos del Programa de Mejoramiento de Yuca.
4. Por medio de la termoterapia y el cultivo de meristemos, se logra el saneamiento de clones de yuca infectados y a su vez distribución de material limpio.

Agradecimientos

La investigación del Laboratorio de cultivo de tejidos de yuca (CIAT) es patrocinada por Bill and Melinda Gates Foundation.

Referencias

- Carvajal, M., Olaya, C., Lozano, I., Cuervo, M., Castaño, M., & Cuellar, W. (2014). Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research*, 186, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.011>
- Jaramillo, G. (2012). Manihot genetic resources at CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). En B. Ospina Patiño & H. Ceballos (eds.), *Cassava in the third millennium: Modern production, processing, use, and marketing systems* (pp. 321-341). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Latin American and Caribbean Consortium to support Cassava Research and Development (CLAYUCA); Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA). <https://hdl.handle.net/10568/81858>

- Maffa, G., Roa, J. C., Aranzales, E., & Debouck, D. (2010). *Manual de procedimientos para la conservación in vitro del germoplasma del género Manihot*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497p. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Roca, W. M., y Mroginski, L. A. (eds.). (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). <https://hdl.handle.net/10568/53954>
- Segovia, R. J., Bedoya, A., Triviño, W., Ceballos, H., Gálvez E., & Ospina Patiño, B. (2002). Metodología para el endurecimiento masivo de vitroplantas de yuca. En: B. Ospina P, H. Ceballos, E. Alvarez, A. C. Bellotti, L. A. Calvert, V. Arias, L.F. Cadavid, L. B. Pineda, R. G. Llano, M. Cuervo (eds.), *La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización* (pp. 573-584). Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT)-Consortio Latinoamericano para la Investigación y el Desarrollo de la Yuca. <https://www.researchgate.net/publication/228879337>

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE HOJAS DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) MD-2

Diego Salas-Valdivia¹, José Manuel Rodríguez-Domínguez^{1*},
Laura Ahtziri Díaz-Godínez¹, José Juvencio Castañeda-Nava¹ y
Antonia Gutiérrez-Mora¹

RESUMEN

El cultivo de piña (*Ananas comosus* L. Merr) tiene una gran importancia mundial. La fruta es altamente apreciada en el mercado, pero es la variedad MD2 o miel una de las más populares debido a su dulzor. La reproducción asexual, que tradicionalmente se usa en campo, no satisface la demanda de plantas en zonas de cultivo que se encuentran en crecimiento. Debido a esto, la micropropagación se considera como una opción viable para la obtención de plántulas de piña. Una de las técnicas más utilizadas es la organogénesis directa, y el primer paso para realizar un protocolo de micropropagación es el establecimiento de los explantes a multiplicar, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue realizar un protocolo de establecimiento de explantes de hojas de piña var. MD2. Se experimentó con distintos tratamientos de desinfección, en dos experimentos distintos, en cortes de hojas de piña provenientes de campo: en el primero se evaluó el efecto de la presencia o ausencia tanto de lavado con etanol al (70%) por 1 min, como de hipoclorito de sodio (1%) por 7 min, y de solución de nanopartículas de plata (34 mg/L) por 10 min. En el segundo experimento se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de choque térmico (65°C/5 min, 5°C/5 min), de lavado utilizando dos concentraciones de hipoclorito de sodio (0.1 y 1%) por 7 min, y ausencia/presencia de nanopartículas de plata en el medio de cultivo (0, 17, y 34 mg/L). En ambos experimentos se distinguió entre base y parte media de la hoja. Se logró hasta un 80% de establecimiento

¹ Camino arenoso 1227, El Bajío, 45019 Zapopan, Jalisco, México. 33 3345 5200.
*mrodriguez@ciatej.mx

de los explantes utilizando choque térmico, lavados en hipoclorito de sodio (0.1 o 1%) y solución de nanopartículas de plata. No hubo diferencias significativas al utilizar nanopartículas de plata en el medio, ni entre las partes medias y las bases de las hojas. La evaluación de la respuesta organogénica se evaluó tanto en los experimentos en hojas de plantas provenientes de campo como en otro experimento utilizando explantes provenientes de plántulas *in vitro*, siendo estas últimas las únicas que presentaron organogénesis directa (40.6%).

PALABRAS CLAVE

Piña miel, establecimiento, desinfección.

Introducción

La piña (*Ananas comosus* L. Merr) es una bromeliácea de origen sudamericano y una de las frutas tropicales con mayor comercialización a nivel mundial. Se han creado distintas variedades, pero es la MD-2 (también conocida como piña miel) de las más apreciadas por sus características organolépticas (Amar *et al.*, 2015). La propagación de la piña en campo es asexual, a través de estructuras conocidas como hijuelos, que son brotes que, según su posición en la planta, reciben popularmente los nombres de gallos, clavos y coronas. Sin embargo, esta forma de reproducción no siempre tiene la capacidad de satisfacer la demanda de plantas suficiente para el constante crecimiento de la superficie de cultivo de esta especie (Reinhardt *et al.*, 2018).

A lo largo del tiempo, la micropropagación ha sido una alternativa viable para la producción masiva de distintas plantas de interés agronómico. Dentro de las distintas técnicas de micropropagación se encuentran, por ejemplo, la proliferación de yemas axilares, la embriogénesis somática y organogénesis, esta última puede clasificarse como directa o indirecta dependiendo si no se presenta o sí se presenta formación de callo; de igual manera, dependiendo el tipo de órgano que se forma, se clasifica en rizogénesis (formación de raíces adventicias) o caulogénesis (formación de brotes adventicios), siendo las hojas uno de los tejidos más utilizados en esta técnica (Suárez, 2020).

La primera fase de todo protocolo de micropropagación consiste en el establecimiento del material vegetal a utilizar, en condiciones asépticas. Para lograr esto se realizan distintos métodos de desinfección, usando diferentes agentes microbicidas u otros procesos como el choque térmico. Dentro de los agentes desinfectantes destacan el hipoclorito de sodio, el peróxido de hidrógeno, el etanol, el bicloruro de mercurio, las nanopartículas de plata, entre otros.

El objetivo del presente trabajo fue experimentar distintas técnicas de desinfección para lograr el establecimiento de explantes de hoja de piña variedad MD2 en condiciones *in vitro* con el fin de obtener material vegetal aséptico para poder realizar un protocolo de micropropagación mediante organogénesis directa.

Metodología

Se utilizaron hijuelos conocidos como clavos de piña var. MD2, obtenidos del municipio de Tomatlán, Jalisco. Primeramente, las plantas se colocaron en una solución de fungicidas-bactericidas compuesta por Captan® (fosfetil-al 80%), Agri-mycin® (sulfato de estreptomycin, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre) y Bactrol® (estreptomycin, oxitetraciclina) a una concentración de 1 g/L cada uno durante 4 h. Se dejaron secar por tres días en condiciones de invernadero. Posteriormente, se quitaron las hojas siguiendo la fitotaxia de la planta, dejando las hojas más centrales (5 a 8 aprox.) (Fotografía 1). Estas últimas se lavaron con agua y jabón y se cortaron con un bisturí en piezas de 1cm² aproximadamente (Fotografía 2).



Fotografía 1. Proceso de retirar las hojas de las plantas de piñas lavadas



Fotografía 2. Cortes de hojas de plantas de piña realizados con bisturí

Se realizaron dos experimentos para la desinfección de explantes provenientes de las plantas provenientes de campo, en los cuales se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de diversos agentes desinfectantes o técnicas de desinfección para el establecimiento de los explantes en condiciones asépticas (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Primer experimento de desinfección de explantes de hojas de piña

Experimento A			
Tratamiento	Lavado con etanol (1 min)	Lavado con hipoclorito de sodio (7 min)	Lavado con nanopartículas de plata (10 min)
1	70%	0.1%	34 mg/L
2	70%	0.1%	0
3	70%	0	34 mg/L
4	70%	0	0
5	0	0.1%	34 mg/L
6	0	0.1%	0
7	0	0	34 mg/L
8	0	0	0

Tabla 2. Segundo experimento de desinfección de explantes de hojas de piña

Experimento B			
Tratamiento	Choque térmico (65°C/5 min, 4°C/5 min)	Lavado con hipoclorito de sodio (7 min)	Nanopartículas de plata en el medio de cultivo (mg/L)
1	+	0.1%	0
2	+	0.1%	17
3	+	0.1%	34
4	+	1%	0
5	+	1%	17
6	+	1%	34
7	-	0.1%	0
8	-	0.1%	17
9	-	0.1%	34
10	-	1%	0
11	-	1%	17
12	-	1%	34

Aplicación de choque térmico (+), Sin aplicación de choque térmico (-).

Después de realizados los tratamientos de desinfección, se colocaron cinco explantes en cajas de Petri con medio MS adicionado con

bencilaminopurina (BA) (2 mg/L) y ácido naftalenacético (ANA) (5 mg/L), 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y se ajustó el pH a 5.8 ± 0.02 (5 repeticiones). En ambos experimentos se distinguió entre las bases de las hojas y las partes medias de las mismas. Pasados 10 días se evaluó el porcentaje de establecimiento.

Finalmente, se hizo un experimento utilizando bases de hojas de vitroplantas ya establecidas en laboratorio con anterioridad, las cuales se colocaron en medio de cultivo líquido con la misma composición que el mencionado anteriormente. Pasados dos meses se contabilizó el porcentaje de respuesta organogénica tanto de los explantes establecidos provenientes de hojas de plantas de campo como de los explantes provenientes de hojas de vitroplantas.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de rangos múltiples para seleccionar los mejores tratamientos. En los casos que no se encontró normalidad, homocedasticidad y/o independencia entre los datos, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis. Se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($p=0.05$). Se utilizaron los programas STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.2.06 e InfoStat Versión 2020.

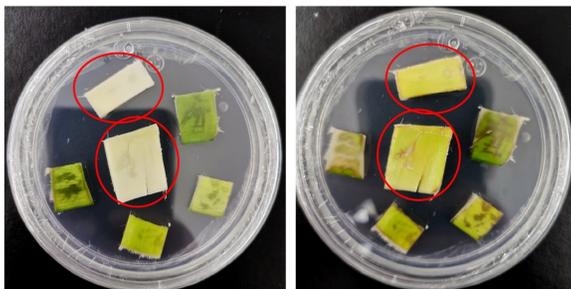
Resultados y discusión

En experimentos previos (datos no mostrados) se encontró que en explantes de menor tamaño a 1 cm^2 , tiempos de inmersión en concentraciones de hipoclorito de sodio por arriba del 1% y/o tiempos de exposición superiores a los 7 min, así como el choque térmico en temperaturas más elevadas, la contaminación era menor, sin embargo, los explantes resultaban dañados de forma severa. El primer experimento mostró que los tres lavados (etanol, hipoclorito de sodio y nanopartículas de plata) son necesarios para obtener los mejores resultados en porcentaje de establecimiento (70%) ($p=0.0001$). En el segundo experimento no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p=0.157$), ni entre la concentración de hipoclorito de sodio ($p=0.164$), ni en las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el medio de cultivo ($p=0.265$), así como

tampoco entre los explantes provenientes tanto de las bases de las hojas como de la parte media de la misma ($p=0.292$). Así mismo, el choque térmico aumentó el porcentaje de establecimiento de forma significativa ($p=0.006$), logrando hasta un 80% de establecimiento de los explantes.

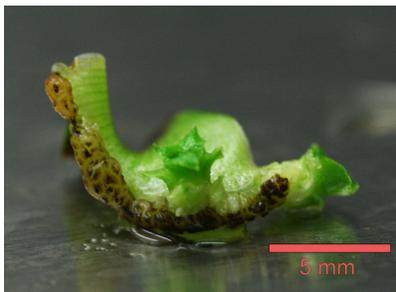
En otros estudios, a diferencia del presente, las nanopartículas de plata han tenido un efecto positivo en la reducción de la contaminación microbiana en los cultivos, así como en la estimulación en la respuesta del material vegetal, como reportan Spinoso-Castillo *et al.* (2017), Pastelín-Solano (2020) y Bello-Bello y Spinoso-Castillo (2023). Comúnmente el choque térmico ha sido utilizado como método de desinfección de explantes en el cultivo *in vitro*, sin embargo, no existen muchas publicaciones donde se experimente su uso, además de en termoterapia para tratar plantas infectadas con virus (Aguilar-Camacho *et al.*, 2016).

Es importante destacar que mientras más agresivo sea el protocolo de desinfección, se reduce la contaminación, pero los explantes resultan dañados severamente. El estrés provocado por la desinfección podría afectar la respuesta de los explantes, ya que sólo se observó un cambio de color de blanco a verde en los explantes provenientes de las bases de las hojas (Fotografía 3) dos semanas después del establecimiento. Esto podría explicar la ausencia de publicaciones sobre desinfección de estos explantes de piña, así como el uso de bases de hojas provenientes exclusivamente de vitroplantas, pero no de plantas de campo, en diversos trabajos publicados sobre organogénesis en piña (Firoozabady & Moy, 2004; Be *et al.*, 2006; Mhatre *et al.*, 2011; Blanco Flores *et al.*, 2017).



Fotografía 3. Bases de hojas de plantas de piña tomando un color verde después de dos semanas en incubación

Este último método fue probado y se obtuvo un porcentaje de respuesta, basado en la formación de brotes, de 40.6% en los explantes provenientes de las bases de hojas (Fotografía 4) y una completa ausencia de respuesta en la parte media de las mismas.



Fotografía 4. Respuesta organogénica en la base de la hoja de vitrolanta de piña

Conclusiones

El establecimiento de explantes de hojas de piña puede lograrse hasta en un 80% con la aplicación de un choque térmico, lavados en etanol al 70% por 1 min, en solución de hipoclorito de sodio en concentraciones de 0.1 o 1% por 7 min, y en solución de nanopartículas de plata

con una concentración de 34 mg/L por 10 min. No se encontraron diferencias significativas en el establecimiento de las bases o partes medias de las hojas, ni en la presencia o ausencia de nanopartículas de plata en el medio. Sólo se observó respuesta organogénica en explantes provenientes de bases de hojas de vitroplantas (40.6%) en medio de cultivo adicionado con 2 mg/L de BA y 5 mg/L de ANA.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado otorgada, al Laboratorio Nacional PlanTECC, y al “Programa de Capacitación y Extensionismo Rural 2021” de la Secretaría de Desarrollo Rural (SADER) por el apoyo otorgado para realizar la presente investigación.

Referencias

- Aguilar-Camacho, M., Mora-Herrera, M. E., & López-Delgado, H. A. (2016). Potato virus X (PVX) elimination as short and long term effects of hydrogen peroxide and salicylic acid is differentially mediated by oxidative stress in synergism with thermotherapy. *American Journal of Potato Research*, 93(4), 360–367. doi:10.1007/s12230-016-9509-5
- Amar, A. T. B., Tong, P. S., & Casey, N. (2015). The MD2 “Super Sweet” pineapple (*Ananas comosus*). *UTAR Agriculture Science Journal*, 1(4), 14-17.
- Be, L. V., & Debergh, P. C. (2006). Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). *South African Journal of Botany*, 72(2), 191-194.
- Bello-Bello, J. J., & Spinoso-Castillo, J. L. (2023). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. Mundo Nano. *Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 16(30), 1e-14e. <https://doi.org/10.22201/cei-ich.24485691e.2023.30.69692>

- Blanco Flores, H. A., Vargas Cedeño, T. E., & García de García, E. C. (2017). Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 7-20.
- Firoozabady, E. & Moy, Y. (2004). Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 40(1), 67-74.
- Mhatre, M., Srinivas, L., & Ganapathi, T. R. (2011). Enhanced iron and zinc accumulation in genetically engineered pineapple plants using soybean ferritin gene. *Biological Trace Element Research*, 144, 1219-1228. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9092-z>
- Pastelín-Solano, M., Ramírez-Mosqueda, M., Bogdanchikova, N., Castro, C., & Bello-Bello, J. (2020). Silver nanoparticles affect the micropropagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agrociencia*, 54, 1-13.
- Reinhardt, D. H. R., Bartholomew, D. P., Souza, F. V. D., Pinto de Carvalho, A. C. P., Pereira de Pádua, T. R., Junghans, D. T., & Pires de Matos, A. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(6), e-302. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018302>
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>
- Suárez, P. I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>

COMPARACIÓN DE TRES SISTEMAS DE CULTIVO *In vitro* EN LA MICROTUBERIZACIÓN DE *Dioscorea alata*

Laura Ahtziri Díaz Godínez¹, Fernando Santacruz Ruvalcaba^{2*} y
José Juvencio Castañeda Nava¹

RESUMEN

Los tubérculos del género *Dioscorea* presentan importancia alimenticia, farmacéutica y económica, se distribuyen principalmente en zonas pantropicales y su cultivo se basa en la segmentación y posterior brotación a partir de los tubérculos maduros de un cultivo anterior; sin embargo, estos se ven afectados por problemas fitosanitarios. El uso de métodos alternativos de cultivo *in vitro* como la microtuberización y el uso de sistemas de inmersión temporal han permitido una propagación vegetal limpia, de calidad, así como un aumento en la cantidad de material obtenido y una disminución en costos de producción. El objetivo del trabajo fue la evaluación de tres sistemas de cultivo *in vitro*, el sistema RITA® con inyección de aire, el sistema Orbitación® sin flujo de aire y un sistema de cultivo *in vitro* convencional en semisólido, además de evaluar tres concentraciones de ácido jasmónico (0.0, 2.60, 5.20 mg/L) para la inducción y el desarrollo de microtubérculos. Las variables que se evaluaron fueron el número de microtubérculos, largo, diámetro y peso fresco de microtubérculos obtenidos. Los resultados mostraron que el uso del sistema RITA favoreció únicamente el número de microtubérculos, produciendo cinco veces más microtubérculos con respecto al semisólido, mientras que las bajas concentraciones de JA solo favorecieron la longitud de

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Vegetal, Camino Arenero 1227, C.P. 45019, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México.

² Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Ramón Padilla Sánchez 2100, C.P. 45110, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México.
*fernando.santacruz@academicos.udg.mx

los microtubérculos obtenidos. Para las variables diámetro y peso fresco no se encontraron diferencias significativas.

PALABRAS CLAVE

Dioscoreaceae, sistema de inmersión temporal, Rita, ñame.

Introducción

El ñame (*Dioscorea alata*) es una planta distribuida mundialmente e importante en la alimentación debido a las propiedades nutricionales entre las que se incluye el alto contenido de carbohidratos, proteínas, minerales y aminoácidos esenciales (Rodríguez *et al.*, 2008; González, 2012), además de ser fuente de vitaminas A, E, K y C (Muimba-Kankolongo, 2018). De forma general, el ñame es cultivado vegetativamente por segmentación de tubérculos maduros de una temporada anterior y resiembra al momento de la brotación (aproximadamente 6 meses) (Coursey 1967); sin embargo, este proceso con frecuencia ocasiona problemas fitosanitarios y pérdidas por nemátodos y pudrición del material almacenado (Azeteh *et al.*, 2019). Como alternativa para sustituir o combinar con el cultivo tradicional, se han implementado diversos métodos de cultivo *in vitro* que ayudan en la propagación de especies del género, principalmente evaluando diversos reguladores de crecimiento, concentraciones y fuente de azúcar, tipos de explantes, entre otros (Uduebo, 1971; Mantell *et al.*, 1978; Wheatley *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2004; Heping *et al.*, 2008). Dentro de estos métodos ha destacado la producción de semilla vegetativa o microtubérculos mediante la combinación de diversos factores (Jean & Cappadocia, 1991; John *et al.*, 1993; Young & Ng, 1998), además se han utilizado sistemas denominados de inmersión temporal (SIT), que involucran una alternancia de ciclos de inmersión del tejido vegetal en medio de cultivo líquido y que pueden o no necesitar de un intercambio gaseoso (Rosales *et al.*, 2003; Muñiz, 2018), de tal manera que puedan optimizar los cultivos y disminuir costos de producción (Cabrera *et al.*, 2004; Salazar & Hoyos, 2007; Cabrera *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, el objetivo del trabajo fue

evaluar tres sistemas de cultivo *in vitro* en la microtuberización de *D. alata*: un sistema de inmersión temporal con inyección de aire, un sistema de inmersión mecánica temporal sin intercambio gaseoso y el sistema de cultivo semisólido convencional.

Metodología

Material vegetal

El material vegetal fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. El material vegetal de *Dioscorea alata* fue previamente establecido en medio Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa, 2 mg/L de Kinetina (KIN), 8 g/L de agar y un pH ajustado a 5.8 + .05. Una vez que los explantes crecieron y generaron nuevos brotes, se procedió con la parte experimental.

Diseño experimental

Se realizó un diseño bifactorial (3 x 3), donde se evaluaron tres sistemas de cultivo *in vitro* (SCV), el sistema RITA® (SIT por intercambio de aire), el sistema Orbitación® (SIT) y el sistema convencional semisólido; y tres concentraciones de ácido jasmónico (JA) (0.00, 2.60, 5.20 mg/L). El medio de cultivo base fue MS adicionado con 90 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar únicamente para el medio semisólido y pH ajustado a 5.8 + 0.05. Segmentos nodales sin raíz con dos a tres nudos fueron tomados del material vegetal previamente establecido y se colocaron como explantes en frascos para cada tratamiento que contenían 100 mL de medio de cultivo. Los SIT tuvieron tiempos de inmersión de 1 min y una frecuencia de inmersión de dos veces por semana. Todos los sistemas se colocaron en una incubadora con una temperatura de 27°C + 2°C y un fotoperiodo establecido de 8 h luz / 16 h oscuridad. Posterior a 90 d se evaluó el número de microtubérculos producidos por planta (MTTP), el largo y diámetro de los

microtubérculos y el peso fresco. Se realizaron análisis estadísticos ANOVA y prueba de la mediana de Mood mediante el software Statgraphics® para determinar si existían diferencias significativas utilizando un $\alpha=0.05$.

Resultados y discusión

Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas para los microtubérculos por planta (MTTP) para ambas variables, JA ($P=0.0102$) y SCV ($P=0.0003$) y para la interacción de estas ($P=0.0144$). Puesto que los datos no se ajustaron a la normalidad, se realizó un análisis Kruskal-Wallis y un análisis de la mediana de Mood, los resultados arrojaron diferencias significativas al utilizar el sistema RITA® y sin adicionar concentración de JA (Cuadro 1), donde el número de microtubérculos producidos por planta fueron cinco veces mayor que en sistemas de cultivo convencional. Cabrera *et al.* (2009) reportan una media de 3.20 microtubérculos por planta al utilizar un sistema de inmersión de frascos gemelos, además la microtuberización inició a las 36 semanas; sin embargo, los ciclos de inmersión fueron de 15 min cada seis horas a diferencia del presente estudio donde la inmersión fue menor y se inició la formación de microtubérculos a las 12 semanas.

Cuadro 1. Efecto de las concentraciones de los tres sistemas de cultivo *in vitro* (RITA®, Orbitabión® y semisólido) y la concentración de JA en el número de microtubérculos por planta

		<i>n</i> ≤	<i>n</i> >	MTTP
Valor-P				0.0000
Sistema	JA mg L⁻¹			
Semisólido	0.0	15	3	0.0a
Semisólido	2.60	7	2	0.0a
Semisólido	5.20	7	2	0.0a
RITA®	0.0	3	5	1.0b
RITA®	2.60	8	3	0.0a
RITA®	5.20	13	0	0.0a
Orbitabión®	0.0	40	7	0.0a

Orbitabión®	2.60	34	1	0.0a
Orbitabión®	5.20	40	0	0.0a

Prueba de la mediana de Mood. *En las columnas datos que presentan letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$). $n \leq$ Números menores a la gran mediana. $n >$ Número de eventos mayores a la gran mediana. MTPP: Microtubérculos por planta. Fuente: Díaz-Godínez (2022)

Por otro lado, no se encontró interacción entre los factores JA y sistema de cultivo *in vitro* (SCV) para la variable largo de microtubérculos, además, no se encontraron diferencias significativas para el SCV ($P=0.1773$); no obstante, se encontraron diferencias significativas en la concentración de ácido jasmónico utilizado ($P=0.0343$). La prueba de rangos múltiples reveló que las concentraciones bajas de JA (2.60 mg/L) favorecen el crecimiento longitudinal de los microtubérculos generados (Fig. 1), por otro lado, el diámetro de los de los microtubérculos no presentó diferencias significativas en ninguno de los dos factores (JA: $P=0.0616$, SCV: $P=0.0540$).

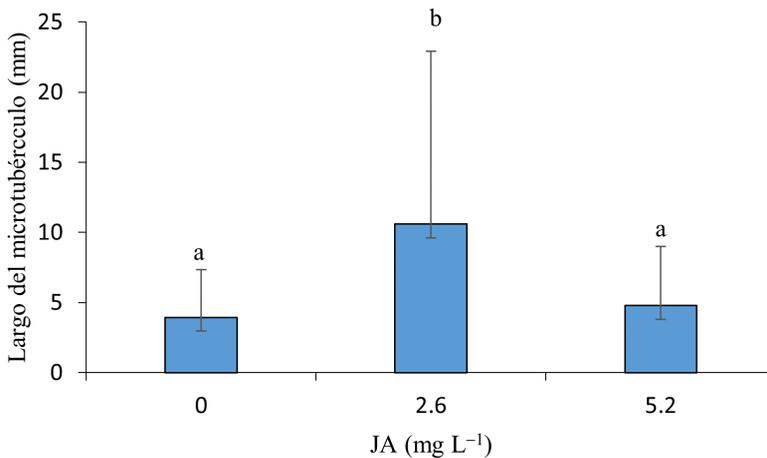


Figura 1. Efecto de las concentraciones de JA en el largo de los microtubérculos de *D. alata* a los 90d de cultivo *in vitro*. Pruebas de rangos múltiples (LSD). Líneas: Desviación estándar. En las barras datos que presentan diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas. Fuente: Díaz-Godínez (2022)

Finalmente, para el peso fresco no se encontraron diferencias significativas en los factores evaluados (JA: $P=0.1789$, SCV: $P=0.5422$). Cabrera *et al.* (2005) mencionan haber obtenido microtubérculos de mayor tamaño al utilizar SIT en *D. alata*, también se ha reportado una mayor tasa de multiplicación y tuberización para *D. alata* al utilizar el sistema RITA® (Salazar & Hoyos, 2007). En *D. fordii* el uso de SIT favoreció la tuberización y disminuyó la vitrificación de explantes (Yan *et al.*, 2011). Lo anterior no concuerda con lo encontrado en este análisis, en el que no se encontró una diferencia significativa para las variables largo, diámetro y peso fresco de los microtubérculos obtenidos. A pesar de las diferencias encontradas entre el análisis realizado y los datos reportados, se han presentado otras ventajas en el uso de los SIT respecto a los sistemas semisólidos *in vitro*, principalmente la reducción de costos al no utilizar sustancias gelificantes y la disminución en los tiempos de renovación de medio de cultivo, reducción de hiperhidricidad de los explantes (Afreen, 2007; Mirzabe *et al.*, 2022), además, favorece el crecimiento de las plantas debido a la disponibilidad de nutrientes y el aumento de área de crecimiento.

Tapia *et al.* (2022) mencionan obtener un 90% de regeneración de plantas de papa al utilizar un sistema de inmersión temporal con respecto al sistema semisólido. En el caso de los sistemas que cuentan con intercambio gaseoso como el sistema RITA®, el flujo continuo de aire favoreció la adaptación en un 80% de las plantas de *D. alata* en invernadero en experimentos posteriores (datos no mostrados). Se ha reportado que este tipos de sistemas favorecen la adaptación *ex vitro* posterior de las plantas a condiciones de invernadero, por ejemplo, se ha obtenido un 100% de adaptación en plantas de arándano y crisantemo y un 96% en plantas de café después del proceso de regeneración *in vitro* en SIT (Huang *et al.*, 2022); mientras que para el caso de aquellos que no cuentan con un sistema de flujo de aire como el sistema Orbitabión® los costos pueden disminuir de manera considerable al utilizar diferentes materiales y equipos de uso rutinario como los agitadores orbitales.

Conclusiones

El sistema RITA, combinado con bajas concentraciones de JA, promueve la microtuberización y optimiza el proceso de cultivo *in vitro* para *D. alata*. Los SIT a su vez disminuyen costos y promueven el crecimiento longitudinal de las plantas al aumentar el espacio disponible para su desarrollo, así mismo, ayuda a la optimización de cultivos y reduce la frecuencia de renovación y resiembra de los cultivos.

Agradecimientos

A la Universidad de Guadalajara y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado de beca durante los estudios de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas No. De CVU 1000970 (Clave de solicitud 2019-000037- 02NACF-06822)

Referencias

- Afree, F. (2007) Temporary immersion bioreactor. En: Gupta, S. D., & Ibaraki, Y. (eds.), *Plant Tissue Culture Engineering, Focus on Biotechnology, vol. 6* (187-201). Springer . https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_11
- Azete, I. N., Rachid, H., Pierre, N. S., Njukeng, P. A., & Kumar, L. (2019) Yam (*Dioscorea* spp.) production trends in Cameroon: A review. *African Journal of Agriculture Research*, 14(26),1097-1110. <https://doi.org/10.5897/AJAR2019.13978>
- Borges, M., Ceiro, W., Meneses, S., Aguilera, N., Vázquez, J., Infante, Z., & Fonseca, M. (2004) Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 76,87-90. <https://doi.org/10.1023/A:1025804516226>
- Cabrera, M., Basail, M., Torres, Y., Robaina, A., Santos, A., Medero, V., Rayas, A., López, J., García, M., Ventura, J. C., & Oliva, M.

- (2004) Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación de segmentos nodales de *Dioscorea alata* L. en el clon 'Pacala Duclos'. *Biotecnología Vegetal*, 4(1),3-8.
- Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., De Feria, M., López, J., Basail, M., y Medero, V. R. (2009) A protocol of yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation in temporary immersion system. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 19-30.
- Coursey, D. G. (1967). Yam storage I: a review of yam storage practices and of information on storage losses. *Journal of Stored Products Research*, 2(3), 229-244. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(67\)90070-7](https://doi.org/10.1016/0022-474X(67)90070-7)
- González, M. E. (2012). El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 05-15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000400001
- Heping, H., Shanlin, G., Lanlan, C., & Xiaoke, J. (2008). *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In vitro Cell Developmental Biology Plant*, 44(5),448-455. <http://www.jstor.org/stable/20461743>.
- Hwang, H. D., Know, S. H., Murthy, H. N., Yun, S. W., Pyo, S. S., & Park, S. Y. (2022). Temporary immersion bioreactor system as an efficient meth for mass production of *in vitro* plants in horticulture and medicinal plants. *Agronomy*, 12(2), 346. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020346>
- Jean, M., y Cappadocia, M. (1991). Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo fuerte" and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell Reports*, 11,34-8. <https://doi.org/10.1007/BF00231836>
- John, J. L., Courtney, W. H., & Decoteau, D. R. (1993). The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 34,245-252. <https://doi.org/10.1007/BF00029713>
- Mantell, S. H., Haque, S. Q., Whithall, A. P. (1978) Clonal propagation of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir yams by tissue culture. *Journal of Horticulture Science*, 51(2),95-98.

- Mirzabe, A. H., Hajiahmad, A., Fadavi, A., & Rafiee, S. (2022) Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. *Journal of Biotechnology*, 357(20),56-83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.003>
- Muimba-Kankolongo, A. (2018). Root and tuber crops. En *Food Crop Production by Small holder Farmers in Southern Africa* (pp. 123-172). Academic Press.
- Muñiz, R. (2018). La propagación *in vitro* de plantas con sistemas de inmersión temporal. Una tecnología apropiada para la agricultura sustentable. *Tekbne*, 21(3),43-50.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3),473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Rodríguez, M., Matheus, J., Gerstl, A., Santana, M. A. (2008). Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia*, 33,532-536.
- Rosales, E., Rodríguez, L. E., Alvarado, O., & Cárdenas M. E. (2003). Diseño y construcción de un Sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*, 30(1),69-72.
- Salazar, R. & Hoyos, R. A. (2007). Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad de Agronomía Medellín*, 60(2),3907-3921.
- Tapia, M. L., Beraún, J. F., Hajari, E., Escalona, M., Etienne, H., & Lorenzo, J. C. (2022). Agronomic performances of temporary immersion bioreactor-derived potato microtuber in Peruvian low input cropping agriculture system. *African Journal of Biotechnology*, 21(3),125-132. <https://doi.org/10.5897/AJB2021.17430>
- Uduebo, A., E. (1971). Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Dioscorea bulbifera*. *Annals of Botany*, 35(139),159-163. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084455>
- Wheatley, A. O., Ahmed, M. H. & Asemota, H. N. (2003). Development of salt adaptation *in vitro* greater yam (*Dioscorea alata*) plantlets. *In vitro Cell Developmental Biology*, 39,346-353. <https://doi.org/10.1079/IVP2002402>

- Yan, H., Yang, L., & Li, Y. (2011). Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. *African Journal of Biotechnology*, *10*(83),19444-19448. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2684>
- Young, S., & Ng, C. (1998) *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, *14*,121-128. <https://doi.org/10.1007/BF00041185>

EFFECTO DE CITOCININAS EN EL RENDIMIENTO DE ZARZAMORA (*Rubus* sp.) VARIEDAD TUPY

Ana Karen Escalera Ordaz¹, Modesto Guijosa Serna¹, Héctor Guillén Andrade^{1*} y Elizabeth Martínez¹

RESUMEN

En México existen nuevas variedades de zarzamora con perfiles de sabor que han incrementado la oferta y la demanda; sin embargo, el cultivo de este fruto se encuentra rodeado de factores adversos que limitan la calidad y el rendimiento. Una labor que ayuda a obtener buenos resultados es la estimulación a través de hormonas que juegan un papel importante en distintas etapas fenológicas. Por lo tanto, el objetivo planteado en el presente trabajo de investigación fue generar conocimiento sobre el efecto de citocininas en el rendimiento del cultivo de la zarzamora (*Rubus* sp.) var Tupy. El experimento se llevó a cabo en la localidad de Camémbaro municipio de Zitácuaro, Michoacán. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar para evaluar cuatro tratamientos: tres concentraciones de citocininas (6.6, 3.3 y 1.6 ml L⁻¹), así como el tratamiento convencional (4.6 ml L⁻¹ citocininas, 23.84 ml L⁻¹ giberelinas y 0.01 ml L⁻¹ auxinas). Asimismo, fueron tomadas en cuenta seis variables: número de botones florales, número de frutos, longitud, peso total de frutos por cargador, diámetro y peso de fruto. Los resultados obtenidos indicaron que la aplicación de citocininas favorece notablemente el rendimiento del cultivo de la zarzamora (*Rubus* sp.) var Tupy. Finalmente, la concentración de 3.3 ml L⁻¹ de citocininas generó la mejor respuesta en el peso total de frutos (34.46 g), el número de botones florales (6.6) y número de frutos (6.6) por cargador.

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología. Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín S/N, Emiliano Zapata, 60170 Uruapan, Michoacán. México. Teléfono: (452)5236474. * hguillenandrade@gmail.com.

PALABRAS CLAVE

Hormonas reguladoras, productividad, floración, citocininas, zarzamora.

Introducción

El cultivo de la zarzamora (*Rubus* sp.) presenta potencial para la exportación debido a su utilidad, versatilidad de uso y alta demanda en Norteamérica (Esquivel *et al.*, 2016), además de sus propiedades nutricionales entre las que destacan los altos contenidos vitamínicos de complejo B, A, C y E, así como el aporte de minerales y propiedades medicinales (Coronado *et al.*, 2014). Debido a esto, la producción de zarzamora en México ha ido creciendo hasta colocar al país como el primer productor a nivel mundial, al aportar una cuarta parte de la producción mundial. En el año 2017 se cosecharon más de 12 000 hectáreas, con una producción que superó las 270 000 toneladas producidas principalmente en 13 estados, de los cuales, Michoacán, Jalisco y Colima son considerados los de mayor impacto en la producción (SADER, 2019). No obstante, la producción nacional se concentra en Michoacán, con un total de 248 303 toneladas, que representan el 96.5% del total (SIAP, 2022).

En México se han generado variedades nuevas y únicas de zarzamora con el objetivo de generar mejores rendimientos con perfiles de sabor que incrementan su demanda; sin embargo, este cultivo se encuentra rodeado de factores adversos como: el factor climático, plagas, enfermedades y prácticas inadecuadas, que limitan la calidad y producción; por lo tanto, es necesario sumar un buen manejo a estas variedades para reducir el efecto de factores adversos. Una labor que ayuda en el manejo de los cultivos para la obtención de buenos resultados es la estimulación por medio de la aplicación de hormonas en distintas etapas fenológicas actuando sobre diferentes procesos fisiológicos. Estas hormonas tienen la capacidad de translocarse al órgano que la planta requiera, pueden acelerar o alterar el funcionamiento del frutal, provocando cambios fisiológicos y morfológicos en el crecimiento, desarrollo y diferenciación, dependiendo del tipo de hormona, concentración y sensibilidad de los tejidos (Cantero 2014;

Llanes *et al.*, 2019; Porta & Jiménez, 2019; Alcántara *et al.*, 2019). Las principales características de las fitohormonas (FH) son las siguientes: actúan como señales químicas que facilitan la comunicación entre células y coordinan sus actividades, ayudan en el control de la respuesta hormonal que se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos a las fitohormonas (Fichet, 2017).

Las citocininas, por su parte, suelen inhibir la germinación de la semilla, elongación de raíces y el desarrollo de pigmentos en la fruta; no obstante, tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, permite estimular el desarrollo fotomorfológico vegetal, diferenciación floral, la formación de yemas caulinares en tejidos indiferenciados (ruptura de la dominancia apical), desarrollo de los cloroplastos e impide la abscisión, senescencia de flores, frutos y hojas. Las citocininas suelen actuar con otros estímulos, especialmente hormonales y ambientales (Rojas, 2010; Fichet, 2017; Lallana *et al.*, 2017; Alcántara, 2019). En la actualidad, estas hormonas se pueden proveer de manera exógena a la planta por medio de aspersiones; sin embargo, existe escasa información sobre las concentraciones y el efecto que pueden generar en el cultivo de la zarzamora. Por lo tanto, es importante conocer la acción de aplicación de hormonas promotoras de la diferenciación floral en respuesta al rendimiento del cultivo. En este sentido, en el presente trabajo de investigación se planteó evaluar el efecto y dosis de citocininas en la productividad del cultivo.

Metodología

Sitio experimental. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en un huerto de zarzamora (*Rubus* sp.) variedad Tupy, denominado “La casa”, ubicado en la localidad de Camébaro municipio de Zitácuaro, Michoacán, ubicado a 19° 25' 46.5" latitud norte y 100° 23' 13.2" longitud oeste a 1940 m.s.n.m. El clima es subtropical húmedo (Cwb) con temperaturas entre 14 y 18 °C y cuenta con una precipitación que oscila entre 1000 a 1200 mm anuales con humedad relativa del 70% (Guillén *et al.*, 2007).

Diseño experimental. El experimento fue establecido bajo un diseño de bloques al azar, para cada uno de los tratamientos se destinaron surcos de zarzamora de 50 m de longitud y 70 cm de diámetro. Una vez señalada el área experimental para cada tratamiento, fue fraccionada en 10 secciones, las cuales indican 10 unidades experimentales de 10 m de longitud con 35 cm de diámetro, posteriormente en cada unidad experimental fueron seleccionados cinco cinco cargadores sin botones florales de aproximadamente 40 a 50 cm, sumando un total de 50 repeticiones por tratamiento.

Descripción de tratamientos. Los tratamientos evaluados consistieron en la aplicación de citocininas tipo forclorfenurón (CPPU) en tres diferentes dosis de concentración (T1, T2 y T3), además, se consideró como tratamiento testigo (T4) la aplicación de la mezcla convencional con el que el productor del sitio experimental ha trabajado el cultivo. En la Tabla 1 se muestra la concentración de citocininas para los tratamientos evaluados.

Tabla 1. Descripción de tratamientos evaluados en el cultivo de zarzamora (*Rubus* sp) var. Tupy

Tratamiento	Concentración
T1	6.6 ml L ⁻¹ de citocininas
T2	3.3 ml L ⁻¹ de citocininas
T3	1.6 ml L ⁻¹ de citocininas
T4	4.6 ml L ⁻¹ de citocininas, 23.84 ml L ⁻¹ de giberelinas y 0.01 ml L ⁻¹ de auxinas

Variables evaluadas. En total fueron evaluadas seis variables: número de botones florales, peso total de frutos por cargador, número de frutos, longitud, diámetro y peso de fruto. Los datos obtenidos de la evaluación fueron documentados en una base de datos en Excel[®] para posterior análisis.

Análisis de datos. Para el análisis de la información se hizo un análisis de varianza con el procedimiento PROC ANOVA para detectar si existen diferencias estadísticas entre tratamientos en las variables evaluadas, de igual forma fueron determinados los estadísticos simples y, finalmente, fue hecha la comparación de medias con la

prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para indicar diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados. Todos los análisis fueron hechos mediante el paquete estadístico Statycal Analysis System (SAS 9.4).

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de citocininas en el rendimiento de zarzamora (*Rubus* sp.) var. Tupy

Los resultados obtenidos del análisis de varianza (PROC ANOVA) hecho para número de botones florales, número de frutos, peso total de frutos por cargador, longitud, peso y diámetro de fruto de zarzamora indicaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha \leq 0.05$) para las variables evaluadas. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos oscilaron de $R^2 = 0.52$ a $R^2 = 0.58$, indicando que los datos se ajustan al modelo utilizado para el análisis de la información. La desviación estándar (DE) en la mayoría de las recolectas fue baja a excepción de la variable peso total de frutos por cargador (DE= 19.05). Los coeficientes de variación fluctuaron entre 11.52 a 65.77, no obstante, las variables que presentaron menor variación fueron: longitud (CV= 11.52), diámetro (CV= 11.59) y peso de fruto (CV= 15.76), esto indica que hubo menor variación en contraste con el número de botones florales, número de frutos y peso total de frutos por cargador. En la Tabla 2 se muestran los estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza practicado para seis variables evaluadas en plantas de zarzamora (*Rubus* sp.) var. Tupy., en respuesta a los cuatro tratamientos evaluados.

Tabla 2. Estadísticos simples obtenidos del análisis de varianza practicado para seis variables evaluadas en plantas de zarzamora (*Rubus* sp.) var. Tupy, ubicadas en Zitácuaro, Michoacán, México

Variable	R ^{2a}	D. E. ^b	Media	C. V. ^c	Pr >F
Número de botones florales	0.56	3.70	5.79	63.91	0.0060
Número de frutos	0.56	3.70	5.79	63.91	0.0060
Peso total de frutos por cargador (g)	0.56	19.05	29.79	63.95	0.0054
Longitud de fruto (cm)	0.52	0.28	2.45	11.52	0.0443

Diámetro de fruto (cm)	0.56	0.21	1.86	11.59	0.0061
Peso de fruto (g)	0.56	0.79	5.07	15.76	0.0083

^aCoefficiente de determinación, ^bDesviación estándar, ^cCoefficiente de variación, ^dProbabilidad de F ($\alpha \leq 0.05$).

Número de botones florales. La adición de citocininas indujo a una respuesta positiva sobre esta variable, al analizar los datos obtenidos de la prueba de Tukey para número de botones florales fue posible distinguir tres grupos estadísticos distintos: en el grupo A fue posicionado el T2 (3.3 ml L⁻¹ de citocininas) con el mayor número de botones florales, en el grupo AB fueron identificados los T1 (6.6 ml L⁻¹ de citoquinas) y T4 (4.6 ml L⁻¹ de citocininas, 23.84 ml L⁻¹ de giberelinas, 0.01 ml L⁻¹ de auxinas), finalmente, el grupo B presentó un menor número de botones florales en respuesta al T3 (1.6 ml L⁻¹ de citocininas) (Tabla 3). La aplicación de citocininas estimuló el incremento de botones florales; sin embargo, dosis bajas o elevadas pueden generar una respuesta contrastante a la que se desea. En los últimos años se ha incrementado el uso de citocininas con el objetivo de incrementar el número de botones florales en rosal (Jarquín *et al.*, 2014; Espitia y Ballén, 2017), en piñón blanco (*Jatropha curcas* L.) (Córdova, 2017), en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Ortega, 2019), en Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) (Ruiz, 2019) y en el cultivo de liliun (*Lilium* sp.) (Jamanca, 2020). La aplicación de citocininas debe hacerse en la etapa de prefloración para obtener mejores rendimientos (Ruiz, 2019).

Número de frutos. Los resultados obtenidos en la prueba de comparación de medias de Tukey indica la formación de tres grupos estadísticos: El T2 (3.3 ml L⁻¹), al generar mejor respuesta para número de frutos con una media de 6.6 frutos por cargador, fue posicionado en el grupo A. El grupo AB fue conformado por el T1 y T4 con valores de media de 5.64 y 6.08, respectivamente. Por su parte, el T3 resultó ser estadísticamente inferior a todos los tratamientos al identificarse en el grupo B con una media de 4.84 frutos por cargador (Tabla 3). Por lo tanto, las citocininas generan una respuesta fisiológica positiva en el rendimiento de zarzamora. En este sentido, el uso y

aplicación de las citocininas ha mostrado ser una labor importante e indispensable en el manejo de diferentes cultivos para promover la retención del fruto (Pantoja, 2019), así como incrementar la cantidad de frutos y por lo tanto mayor rendimiento (Armijos, 2014; Cabrera, 2016; Torres, 2019).

Tabla 3. Comparación de medias para seis variables evaluadas en Zarzamora (*Rubus* sp.) var Tupy, en respuesta a cuatro tratamientos: T1-6.6 ppm citocininas, T2-3.3 ppm citocininas, T3-1.6 ppm citocininas y T4-4.6 ppm citocininas, 23.84 ppm giberelinas y 0.01 ppm auxinas

Variable	Tratamientos							
	T1		T2		T3		T4	
Número de botones florales	5.64	A B	6.6	A	4.84	B	6.08	A B
Número de frutos	5.64	A B	6.6	A	4.84	B	6.08	A B
Peso de frutos por cargador (g)	28.84	A B	34.46	A	24.92	B	30.94	A B
Longitud de fruto (cm)	2.51	A	2.46	A	2.41	A	2.44	A
Diámetro de fruto (cm)	1.90	A	1.88	A B	1.79	B	1.87	A B
Peso de fruto (g)	5.13	A	5.19	A	4.91	A	5.05	A

*Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa (significancia de Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Peso de frutos por cargador. Los resultados obtenidos para el peso total de frutos por cargador indicaron diferencias estadísticas significativas; el T2 (3.3 ml L⁻¹) resultó ser estadísticamente superior a todos los tratamientos con un peso de frutos de 34.46 g, seguido de T1 y T4, mientras que el T3 resultó ser estadísticamente inferior a todos los tratamientos con un peso de 24.92 g (Tabla 3). Las citocininas intervienen en procesos fisiológicos de los frutos al incrementar el rendimiento de cultivos como el arándano (Cano, 2018; Contreras, 2010), chile (Armijos, 2014), uva (Leytón, 2018), frijol (Ortega, 2019), entre otros. No obstante, la respuesta positiva a la aplicación de citocininas depende del cultivo, concentración y etapa de aplicación (Ruiz, 2019).

Longitud de fruto. Los resultados obtenidos para esta variable indican que no existe relación entre la longitud de los frutos y la

aplicación de citocininas, ya que en la comparación de medias de la prueba de Tukey no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Tabla 3). Sin embargo, existen reportes de su efecto en la longitud de la panícula del arroz (*Oryza sativa* L.) (Romero, 2016) y de sandía mini (Villatoro, 2014), pero con concentraciones de 2,0 L ha⁻¹ y 150 ppm.

Diámetro de fruto. El mayor diámetro del fruto de zarzamora se obtuvo con la dosis de 6.6 ml L⁻¹ con un 4.3 % mayor al diámetro obtenido con el tratamiento convencional. De acuerdo con la prueba de Tukey, el T1 generó una mejor respuesta para el diámetro de fruto seguido del T2 y T4, al ubicarse en el grupo estadístico AB. En contraste, el T3 (1.6 ml L⁻¹) con un diámetro de 1.79 fue estadísticamente inferior a todos los tratamientos (Tabla 3). Por lo tanto, es posible afirmar que las citocininas aumentan el diámetro de frutos de zarzamora, como en el caso de la sandía (Villatoro, 2014) e incluso en los cultivos de manzana Golden Delicious y Royal Gala, donde fue posible incrementar el tamaño de los frutos en más de un 50% con dosis de 10 ppm de citocininas. De acuerdo a lo anterior, la aplicación de citocininas a poblaciones de plantas es considerada una herramienta para elevar el número de células y darle potencial para mejorar el tamaño de la fruta y cosecha incrementado así el rendimiento del cultivo (Villatoro 2014).

Peso de fruto. El peso es un factor determinante en la calidad del fruto para el consumo y exportación debido a que este producto se comercializa generalmente en unidades de peso, por lo cual la ganancia económica va a la par con la cantidad producida expresada en pesos (Villatoro, 2014). Sin embargo, aunque se identificó un incremento en el peso de frutos al utilizar el T2, se determina que el peso unitario no fue influenciado por las dosis de citocininas evaluadas debido a que los tratamientos se comportaron estadísticamente iguales (Tabla 3). Estos resultados contrastan con lo reportado en otros trabajos, en donde se indica que al hacer aplicaciones de citocininas es posible aumentar significativamente el calibre y la producción de frutos (Arancibia, 2005; Contreras, 2010; Aza, 2014 y Leytón, 2018). Esto puede deberse a que en el cultivo de la zarzamora la acción de las

citocininas se haya centrado en estimular la generación de brotes axilares (Alcántara *et al.*, 2019).

Conclusiones

La aplicación de citocininas favorece el rendimiento del cultivo de la zarzamora al incrementar el número de botones florales, número de frutos, peso total de frutos por cargador y diámetro de fruto. El T2 (3.3 ml L⁻¹ de citocininas) generó mejor respuesta para peso total de frutos por cargador, así como el número de botones florales y frutos de zarzamora (*Rubus* sp.) var. Tupy.

Agradecimientos

A la UIAA-Facultad de Agrobiología-UMSNH por el apoyo con las instalaciones para la ejecución de las actividades de investigación.

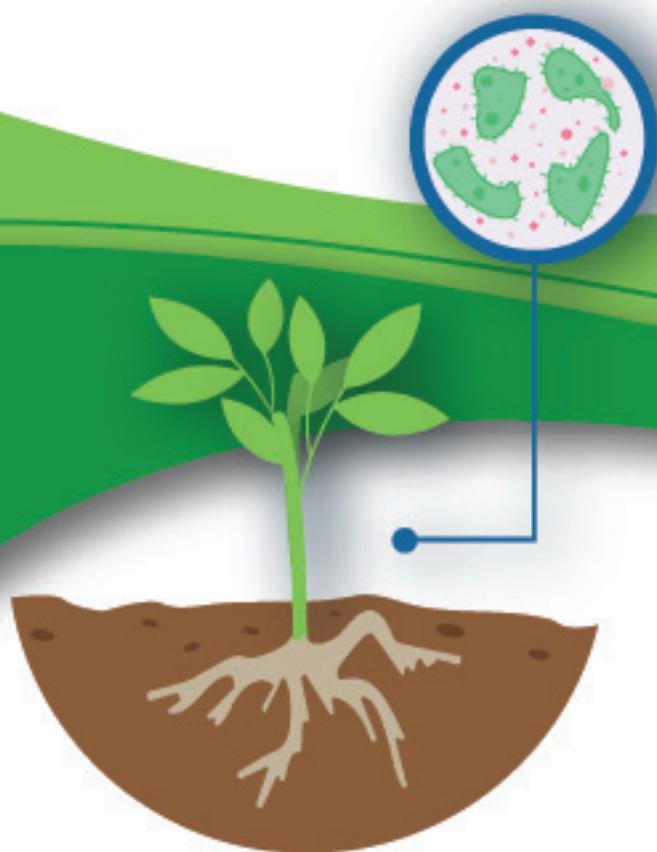
Referencia

- Alcántara C. J. S., Acero G. J., Alcántara C. J. D. & Sánchez M. R. M. (2019). Main hormonal regulators and their interactions in plant growth. *Revista NOVA*. 17(32), 109-129. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s179424702019000200109&lng=en&tlng=es
- Armijos E. S. I. (2014). *Respuesta del pimiento (capsicum annum l.) A la aplicación de bioestimulantes en la parroquia el progreso, cantón pasaje* [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio institucional UTMACH. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1065>
- Cabrera C. R. (2016). *Determinación del momento oportuno para la inducción floral de Jatropha curcas l., utilizando ba (6-benciladenina) en Juan Guerra-San Martín-Perú* [tesis de grado, Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto]. Repositorio institucional UNSM. <http://hdl.handle.net/11458/2149>

- Córdova M. E. S. (2017). *Efecto de tres dosis de 6- benciladenina en el incremento de la floración de piñón blanco (Jatropha curcas L.) – Juan Guerra – San Martín – Perú* [tesis de grado, Universidad nacional de San Martín-Tarapoto. Repositorio institucional UNSM. <http://hdl.handle.net/11458/792>
- Coronado G., García P. M. A., Hernández M. S., Córdova Y. V.G. & Vásquez N.A., Ángel. (2014). La zarzamora, un mercado potencial para los productores agropecuarios de la sierra de sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 34(1), 784-794.
- Espitia F. F. (2017). *Evaluación del efecto del fitorregulador (n6-bencilaminopurina) sobre la productividad y calidad en el cultivo de rosa (Rosa sp) variedad freedom bajo invernadero Empresa Jardines del rosal s.a.s de la Sabana de Bogotá* [tesis de grado Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. Repositorio institucional UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21634>
- Esquivel P. G., Gudiño C.E., Rojas M. J. P. & Ramírez M. C. A. (2016). Evaluación de fertilizantes foliares orgánicos e inorgánicos en zarzamora (*Rubus sp.*) var. “tupi”. *Ciencia Nicolaita*, 67(1), 25-36.
- Fichet, L. T. (2017). Biosíntesis de las fitohormonas y modo de acción de los reguladores de crecimiento. *Serie nutrición vegetal*, 92(1), 1-6.
- Guillen A. H., Blanca N. L. C., Gutiérrez C. M., Ortiz C. M. & Ángel P. M. E. (2007). *Cartografía agroecología del cultivo del aguacate en Michoacán*. Morevallado editores de Morelia. México. 141p.
- Jarquín N. I. A., Rodríguez M. J. C., Lagunes T. Á., Llanderal C., Celina P., Nava D. V. M., Aguayo C. G., (2014). Use of cytoquinins and floral protectors to enhance the quality of cut-rose flower buds. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 20(3), 297-305.
- Jamanca L. K. J. (2020). *Efecto de la aplicación de tres dosis de citoquinina en la producción de botones florales en el cultivo de liliom (Lilium sp.) En el distrito de independencia – huaraç - ancash, 2018* [tesis ingeniería, Universidad Nacional “Santiago Antúnez de Mayolo”]. Repositorio institucional UNASAM. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/4198>
- Llanes A., Iparraguirre J., Masciarelli O., Maria N., Luna V. (2019). Foliar application of phytohormones enhances growth of maize

- and soybean seedlings. *Ria. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45 (1), 61-66. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86458941005>
- Porta H., y Jiménez N. G. (2019). Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(1), 1-11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.160>.

Biotecnología de microorganismos de suelo y planta



INTRODUCCIÓN

En esta sección se describen los avances con respecto a algunos tipos de control químico y biológico de plagas y enfermedades de plantas de interés agrícola en Latinoamérica, así como el uso de alternativas como las feromonas atrayentes hacia trampas, y el uso de “elicitores” para inducir el sistema de defensa de las plantas. Los hongos formadores de micorrizas y las bacterias promotoras de crecimiento también se plantean como un método de biocontrol. Adicionalmente, el caracterizar a hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* para establecer estrategias de control basados en las buenas prácticas se abordan en este tópico.

Los microorganismos benéficos a plantas como los hongos formadores de micorrizas y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal juegan un papel primordial en los sistemas agrícolas para el mejor aprovechamiento de los nutrientes en el suelo y de los fertilizantes químicos que se agregan. El uso de microorganismo benéficos ayuda a disminuir los costos de producción y a incrementar los rendimientos de los cultivos.

En uno de los trabajos presentados en esta sección se describe que la fertilización química y biológica de la caña permite una mayor eficiencia agronómica de la práctica de fertilización del cultivo de caña. El control biológico de enfermedades fúngicas y bacterianas de cultivos como el jitomate es una herramienta muy importante para suplir a los microbicidas químicos en los campos agrícolas. En esta sección se describe cómo bacterias del género *Bacillus* spp. son capaces de controlar a hongos fitopatógenos del género *Fusarium* y *Alternaria*, además de funcionar como bioestimulantes en el crecimiento del jitomate. Así mismo, se observaron mejoras en los tratamientos preventivos que en correctivos con *Bacillus* spp.

El control biológico de insectos plaga en cultivos agrícolas como membrillo son de suma importancia para la economía. Los métodos de control mediante la captura de insectos con trampas de feromonas es otro método utilizado como alternativa a los insecticidas químicos recalcitrantes. En esta sección se describe una efectividad de hasta un 50% en la captura del insecto *Cydia pomonella* Mill (Palomilla del membrillero) mediante el uso trampa tipo delta impregnada con feromonas (BIOLURE®), comparado con la trampa tipo ala.

El uso enemigos naturales de los insectos como los parasitoides es una estrategia adicional para el control de insectos plaga de los cultivos agrícolas. El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* Smith, ataca a los cultivos de maíz, en el cual se utilizarán avispas *Meteorus arizonensis* y *M. laphygmae* para el control de estos insectos plaga.

El uso “elicitors” como el jasmonato y el ácido salicílico desencadenan la respuesta de defensa en las plantas, lo que conlleva a una mayor resistencia a enfermedades por hongos patógenos. La aplicación de estos elicitors a plantas de aguacate mostró un efecto en la actividad enzimática y acumulación de compuestos fenólicos a nivel local como sistémico junto con la aplicación del patógeno *Fusarium* spp. La utilización de estos compuestos puede representar una alternativa para inducir una respuesta de defensa en las plantas, aumentando su resistencia ante enfermedades. De igual forma, el conocer a los patógenos como los hongos, en particular a *B. cinerea*, el cual infecta a más de 200 especies de plantas, también ayuda a su control biológico ya que cada aislado puede variar y su presencia puede ser controlada por buenas prácticas. En conclusión, los trabajos aquí presentados muestran una migración de un control químico de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas a métodos de biocontrol más amigables con el medio ambiente.

Dr. Sergio Casas Flores
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

EFFECTO DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZA ARBUSCULAR EN LA PRODUCTIVIDAD Y RENTABILIDAD DE LA CAÑA DE AZÚCAR PARA PANELA

Carlos Felipe Gonzalez-Chavarro^{1*}, María Margarita Ramírez-Gómez²,
Diana Paola Serralde-Ordóñez², Andrea María Peñaranda-Rolon² y
Ayda Fernanda Barona-Rodríguez³

RESUMEN

La producción de panela en Colombia es una actividad agrícola relevante del país a nivel socioeconómico en modelos de producción campesina, por tal razón se planteó la necesidad de identificar las recomendaciones de fertilización química y biológica en la subregión natural Hoya del río Suarez (HRS), ubicada entre los departamentos de Boyacá y Santander, que ostentan la mayor productividad superando las 8,8 y 9,3 ton*ha⁻¹ de panela respectivamente; sin embargo, la fertilización, principalmente química, tiene hasta un 24,3% de participación en los costos de producción, lo cual, además de su impacto ambiental, resulta con un margen de rentabilidad altamente susceptible a la inflación del país. Por consiguiente, el uso de fuentes químicas y biológicas es fundamental para la competitividad y sostenibilidad del sistema productivo. Teniendo en cuenta la oportunidad de valorizar los microorganismos, se estableció un lote experimental en la localidad de Güepsa (Santander), con dos variedades (CC 93-7711 y CC 93-7510) en estudio donde se evaluaron combinaciones de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y bacterias promotoras de crecimiento (BPCV). Se emplearon diseños de bloques completos

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia, Centro de Investigación La Libertad, km 17 vía Puerto López, Villavicencio, Colombia 500008. *cfgonzalez@agrosavia.co

² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia, Centro de Investigación Tibaitatá, km 14 vía Mosquera - Bogotá, Colombia 250047.

³ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia, Centro de Investigación Tibaitatá sede Cimpa, km 2 vía antigua Cite, Barbosa, Colombia 684511.

al azar con tres replicas y se evaluaron los contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio en los tallos y las variables de producción de caña, así como un análisis económico para cada tratamiento. La adecuada fertilización de la caña, basada en análisis de suelos, requerimientos nutricionales y el uso de diversas fuentes, permitió una mayor eficiencia agronómica y económica de la práctica de fertilización del cultivo, reduciendo la degradación química y biológica de los suelos.

PALABRAS CLAVE

Biofertilizantes, nutrición vegetal, azúcar no centrifugado, microorganismos.

Introducción

A partir de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se obtienen diversos productos para la alimentación humana y animal. Es el tercer cultivo más importante a nivel mundial, y su principal producto es el azúcar (Faostat, 2021), su producción se distribuye en América (51,7%), Asia (41,4%), Oceanía (1,8%) y África (5,1%), también se obtiene el azúcar no centrifugado o panela, conocida como rapadura (Brasil), piloncillo (México), papelón (Venezuela), chancaca (Chile, Perú), jaggery (India), Gula Melaka (Malasia) y brown sugar (USA) (Jaffé, 2012), el segundo productor en el mundo es Colombia con 1002 toneladas (MADR, 2020).

En Colombia el cultivo de la caña de azúcar para panela se desarrolla en condiciones de ladera, se utilizan generalmente fertilizantes químicos que incrementan la productividad, pero a su vez suben los costos de producción y crean una alta dependencia (Durán *et al.*, 2014). Una de las principales limitantes en la mayoría de los sistemas de producción de caña panelera a nivel nacional está relacionado con estrés hídrico y nutricional (Osorio, 2007); no obstante, las raíces de las plantas interactúan con la rizosfera creando relaciones benéficas con los microorganismos, que aumenta la eficiencia en absorción de nutrientes y agua como lo son los hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA) y las bacterias promotoras de crecimiento vegetal

(BPCV). En cultivos semi permanentes como la caña panelera, los HFMA-BPCV juegan un papel importante en el ciclaje de nutrientes permitiendo mejoras sustanciales en la nutrición del cultivo y reducción en el uso de enmiendas y fertilizantes de síntesis química (Nadeem *et al.*, 2015; Datta y Kulkarni, 2012). En etapas tempranas del cultivo, que requiere formación de raíces, por ende estos microorganismos son capaces de interactuar con el suelo, para aumentar la actividad microbiana, con una diversidad de interacciones basadas en señalizaciones moleculares (Dardanelli *et al.*, 2010), influyendo significativamente en el crecimiento de las plantas, a través de la solubilización del fósforo o producción de sideróforos, la inducción de fitohormonas, la activación de rizobacterias capaces de promover la fijación biológica de nitrógeno, la liberación de sustancias como ácido cianhídrico, pectinasas, lipopéptidos, antibióticos responsables del control de patógenos en las plantas, homeoreguladoras del estrés por la liberación de moléculas activas como ácido abscísico, salicílico y jasmónico y poliaminas como cadaverina o mediante la actividad de enzimas como la deaminasa (Morgado *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017; Sulistiono *et al.*, 2017).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la aplicación de fertilización química y biológica con el uso de Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) y Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) como biofertilizantes del cultivo de caña de azúcar en el municipio de Güepsa, Santander - Colombia.

Metodología

El experimento se estableció en el municipio de Güepsa (Santander), con un diseño en BCA con las variedades CC 93-7711 (V1) y CC 93-7510 (V2) y tres repeticiones. Los tratamientos evaluados (Tabla 1) incluyen cepas de HFMA – BPCV y fertilización química (FQ), de acuerdo con el análisis de suelo en dosis de 50% y 100% como testigos. El lote experimental estuvo conformado por unidades experimentales (UE) de cinco surcos con una longitud de 5,4 m, la densidad de siembra fue 0,6m entre plantas y 1,3m entre surcos (45

plantas*UE-1), se dejaron 2 m entre UE como áreas de tránsito, la inoculación se realizó en vivero garantizando 70 esporas*gramo⁻¹ de HFMA y se aplicó 10 ml a cada plántula del inóculo bacteriano a una concentración de 1x10⁸ UFC de BPCV.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos, microorganismos y fertilización química

Tratamientos	Descripción
T1	HFMA 1 + FQ 50%.
T2	HFMA 2 + BPCV 1+ FQ 50%.
T3	HFMA 1 + BPCV 2 + FQ 50%.
T4	Testigo FQ 50%.
T5	Testigo FQ 100%.

Fuente: Elaboración propia.

Con relación a los planes de fertilización, tuvieron como base los siguientes requerimientos nutricionales donde se incluyó la aplicación de enmiendas, elementos mayores y menores: N (170 kg), P₂O₅ (50 kg), K₂O (240 kg), Ca (90 kg), MgO (60 kg), S (45 Kg), Si (320 kg), Fe (12 kg), Mn (1,5 kg), Cu (0,128 kg), Zn (1,8 kg), B (0,522 kg). Se diseñó el esquema de fertilización para los tratamientos de inoculación y el testigo con el 50% de fertilización, para el tratamiento con el 100% de la fertilización se empleó el doble de la cantidad (Tabla 2).

Tabla 2. Esquema del plan de fertilización para todos los tratamientos

Tratamientos	T1 – T4		T5	
Fertilización	50%		100%	
Aplicación (meses después de siembra)	2	4	2	4
Insumo	Cantidad (kg*UE-1)			
Urea ®	1,71	75	3,42	150
KCl ®	1,49	30	2,98	60
DAP ®	0,42	-	0,84	-
Kieserita ®	1,44	63,75	2,88	127,5
Fertimenes ®	0,18	10,9	0,36	21,8
Microman ®	0,45	26,2	0,9	52,4
Borozinc ®	0,34	20	0,68	40

Magnesil ®	-	-	-	-
Cal dolomita ®	5,62	-	11,24	-
Avicompost ® (Materia orgánica)	8,4	-	16,8	-

Fuente: Elaboración propia.

A los 17 meses que se realizó la cosecha, se colectaron los tallos siguiendo la metodología de bertsch (2003), para estimar la concentración y extracción de nitrógeno, fósforo y potasio, nutrientes que mayor movilidad ganan en la planta con la inoculación de hfma-bpcv. Una vez obtenidos los resultados a través de los métodos de extracción y de cuantificación, usados por el laboratorio de química de suelos, aguas y plantas de Agrosavia C.I. Tibaitatá, se determinó la materia seca en laboratorio y los datos fueron transformados matemáticamente siguiendo la metodología de gonzález *et al.* (2018) para obtener el nutriente en $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; luego se evaluó la productividad en toneladas de caña hectárea ($\text{ton caña} \cdot \text{ha}^{-1}$) y se estimaron los costos de producción del cultivo en pesos colombianos (cop). Los costos directos incluyeron mano de obra, adecuación del terreno, semilla, fertilizantes, plaguicidas (insecticidas, herbicidas y coadyuvantes), manejo fitosanitario, corte, alce y transporte al centro de procesamiento y en los costos indirectos el arriendo.

Resultados y discusión

Análisis de tejido vegetal

La extracción de nitrógeno, fósforo y potasio en los tallos no tuvo diferencias estadísticamente significativas, en la CC 93-7711 el T1 tuvo el mayor valor superando a T4 en 30,1% (fosforo), 26,1% (potasio) y 24,1% (nitrógeno), el T2 supero a T4 en 15,3% (fosforo) y 16,7% (nitrógeno); para CC 93-7510 únicamente el T2 supero a T4 en 6,1% para nitrógeno y T3 tuvo el menor valor en todos los elementos (Tabla 3). Con respecto a estudios realizados por Wilches *et al.* (2022), quienes analizaron nutrientes totales, los valores obtenidos son inferiores debido a que solo se analizó el órgano de importancia “tallos” pero

se encontró un comportamiento favorable de la inoculación con un aumento del 29% de nitrógeno y 36% de fósforo en los tejidos vegetales (hojas, yaguas, cogollos y tallos) de la CC 93-7711, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. En otro estudio Juntahum *et al.* (2020) evaluaron HFMA (*Funneliformis mosseae*) y encontraron una acumulación superior al 42% en comparación con tratamientos no inoculados. Un estudio con BPCV Leal (2017) determinó que el efecto del aislamiento 6C07 (*Bacillus megaterium*) en la variedad CC 93-7711 presentó un efecto consistente incrementando la longitud, peso y diámetro del tallo, mostrando una capacidad de solubilización de fosfato tricálcico y de aluminio, y la mineralización del ácido fítico, que favorece la disponibilidad de P para las plantas.

Tabla 3. Resultados de análisis de tejido vegetal (tallos) para las variedades CC 93-7711 y CC 93-7510

Variedad	Nutriente	Tratamientos				
		T1	T2	T3	T4	T5
CC 93-7711	Nitrógeno	46,34 a	42,25 a	35,37 a	35,18 a	45,75 a
	Fósforo	12,83 a	10,58 a	7,99 a	8,96 a	9,54 a
	Potasio	45,9 a	29,17 a	31,06 a	33,94 a	29,21 a
CC 93-7510	Nitrógeno	45,18 a	46,75 a	26,43 a	43,92 a	47,67 a
	Fósforo	9,73 a	10,03 a	7,15 a	12,48 a	10,8 a
	Potasio	45,22 a	29,17 a	31,06 a	33,94 a	29,21 a

Fuente: Elaboración propia.

Productividad de CC 93-7711 y CC 93-7510

A continuación, se presentan los resultados relacionados con la producción de caña (Figura 1). De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA), no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para las dos variedades; sin embargo, se observa para el caso de la variedad CC 93-7711 que el tratamiento que registró los mayores valores de producción fue el T1 con 160 toneladas de caña*ha⁻¹, superando a todos los tratamientos (> 150 ton de caña*ha⁻¹), incluidos los testigos de fertilización. Mientras que para el caso de la variedad CC 93-7510,

el testigo 50% de fertilización (T4) registró los mayores valores de producción con 177 ton de caña*ha-1, superando a los tratamientos con microorganismos benéficos (< 154 ton de caña*ha-1) y el testigo 100% (T5). La información concuerda con lo obtenido por Wilches (2022), quien obtuvo 157,5 ton de caña*ha-1 utilizando el inóculo *Rhizopagus irregularis*. En Brasil, evaluando BPCV, específicamente la bacteria *Azospirillum brasilense*, Velasco-Velasco (2014) obtuvieron comportamientos similares a los observados con dosis de nitrógeno (300 kg*ha-1) incrementado los rendimientos gracias al aporte de fitohormonas en el crecimiento vegetal, capacidad de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos inorgánicos en compuestos de aluminio, hierro y calcio (Alarcón & Ferrera-Cerrato, 2000), contribuyendo así a la sustitución de fertilizante químico (Sulistono *et al.*, 2017 y 2020).

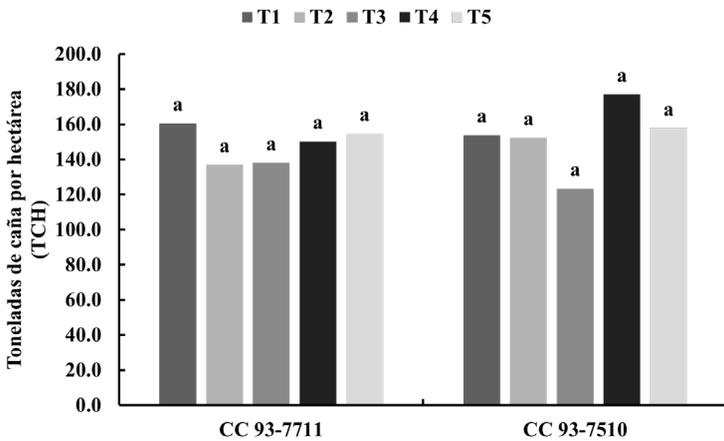


Figura 1. Productividad de los tratamientos en toneladas de caña por hectárea
Fuente: Elaboración propia.

Costos de producción

La estructura de costos directos e indirectos de la producción de caña para cada uno de los tratamientos evaluados presentó un com-

portamiento diferencial. Para los tratamientos de inoculación del T1 al T3 los costos totales fueron de \$21.339.200 COP, para el testigo 50% de fertilización (T4) \$21.099.200 COP y para el testigo 100% de fertilización (T5) \$22.451.300 COP. La diferencia radica en que los tratamientos con microorganismos benéficos reduce el costo de fertilización al 50%, ya que se emplea la mitad de los fertilizantes respecto al tratamiento testigo 100% (T5). Además, los tratamientos del T1 al T3 incluyen el costo de las micorrizas en el momento de la inoculación de las plántulas de caña en vivero (Tabla 4).

Tabla 4. Costos de producción de caña bajo tratamientos evaluados

Tipos de costos y actividades	Valor T1-T3 + FQ	Valor T4 + FQ	Valor T5 + FQ
	50%	50%	100%
Adecuación del lote	\$910.000	\$910.000	\$910.000
Mano de obra (prácticas culturales)	\$2'370.000	\$2'370.000	\$2'370.000
Semilla (Plántula)	\$7'462.000	\$7'462.000	\$7'462.000
Fertilizantes	\$1'609.200	\$1'609.200	\$2'961.300
Microorganismos (HFMA y BPCV)	\$240.000	-	-
Otros (Equipos, herramientas y plaguicidas)	\$588.000	\$588.000	\$588.000
Corte, alce y transporte	\$7'200.000	\$7'200.000	\$7'200.000
Subtotal de costos directos	\$20'379.200	\$20'139.200	\$21'491.300
Costos indirectos			
Arriendo	\$960.000	\$960.000	\$960.000
Costos totales del cultivo	\$21'339.200	\$21'099.200	\$22'451.300

*Pesos colombianos (COP)

Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente, se calcularon los costos para producir 1 tonelada de caña, teniendo en cuenta los costos totales de producción y las toneladas de caña por hectárea producidas en cosecha. Para la variedad CC 93-7711 el T1 equivale a \$132.883 COP ton*caña-1, T2 equivale a \$155.790 COP ton*caña-1, T3 \$154.555 COP ton*caña-1, el testigo 50% (T4) equivale a \$140.408 COP ton*caña-1 y el testigo 100% (T5) equivale a \$145.045 COP ton*caña-1. Para el caso de la variedad CC 93-7510 el T1 equivale a \$138.629 COP ton*caña-1, T2

equivale a \$140.055 COP ton*caña-1, el T3 \$172.866 COP ton*caña-1, el testigo 50% (T4) equivale a \$119.193 COP ton*caña-1 y el testigo 100% (T5) equivale a \$142.322 COP ton*caña-1.

Al comparar los costos de los tratamientos inoculados con el testigo 100% de fertilización química (T5), se puede apreciar que para la variedad CC 93-7711, T1 presentó el menor costo para producir una tonelada de caña, ya que se puede lograr una reducción de 8,4% y para la variedad CC 93-7510, T1 logró una reducción de 2,6%; con el T2, de 1,6% (Tabla 5). De acuerdo con Ortega *et al.* (2009), existen reportes de BPCV que sustituyeron entre 25% a 32% los fertilizantes de síntesis química en más del 76% de las experiencias evaluadas en campo, mostrando respuesta positiva e incrementos de entre 25% y 35% en el rendimiento.

Tabla 5. Reducción del costo de fertilización de los tratamientos con respecto al tratamiento 5 (Testigo FQ 100%)

Tratamiento	Descripción	CC 93-7711	CC 93-7510
T1	HFMA	\$12.161	\$3.692
T2	HFMA2 + BPCV1	-	\$2.267
T3	HFMA1 + BPCV2	-	-

*Pesos colombianos (COP)

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

La inoculación con HFMA-BPCV es un factor importante para promover la productividad de la caña de azúcar para panela, puesto que genera beneficios en la productividad, microbiología del suelo y podría resultar en una reducción sustancial hasta del 50% del fertilizante de síntesis química a través de la interacción de los microorganismos con potencial biofertilizante capaces de colonizar las raíces de las plantas y generar exudados radiculares que incrementen los compuestos orgánicos como auxinas, vitaminas, azúcares como fuentes de carbono y energía, incrementando el desarrollo y la rentabilidad del cultivo.

Agradecimientos

Al Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR), por la financiación y AGROSAVIA C.I. Tibaitatá sede Cimpa, por la ejecución de la investigación.

Referencias

- Alarcón, A. & Ferrera-Cerrato, R. (2000). Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México*, 26(2), 191-203.
- Bertsch, F. (2003). *Absorción de nutrimentos por los cultivos*. Ed. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo (San José, Costa Rica). <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/A01-8385-pag88-89.pdf>
- Dardanelli, M. S., Manyani, H., González-Barroso, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., Gil-serrano, A. M., Espuny, M. R., López-Baena, F. J., Bellogin, R. A., Megías, M. & Ollero, F. J. (2010). Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil*, 328,483-493. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0127-6>
- Datta, P. & Kulkarni, M. (2012). Arbuscular Mycorrhizal Fungal Diversity in Sugarcane Rhizosphere in Relation with Soil Properties. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(1), 66-74. <https://doi.org/10.15835/nsb416567>
- Durán, J. R., Insuasty, O. & Viveros, C. A. (2014). Comportamiento agroindustrial de diez variedades de caña de azúcar para producción de panela en Santander, Colombia. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), 183–195. https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num2_art:358
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. FAOSTAT. FAO. Accedido en marzo, 2023.
- González Chavarro, F., Cabezas Gutiérrez, M., Ramírez-Gómez, M. & Durán, J. R. (2018). Macronutrient absorption curves in three va-

- ieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) for panela in the Hoya Del Río Suárez. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 21(2), 395-404. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.995>
- Jaffé, W. (2012). Health effects of non-centrifugal sugar Review. *Sugar Tech*, 14(2), 87-94. <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0145-1>
- Leal M., G. I. (2017). *Selección de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, provenientes de cultivos de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes* [tesis maestría Universidad Nacional de Colombia] Repositorio Institucional UDEA. <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/>
- Morgado Gonzalez, A., Espinosa Victoria, D. & Gomez Merino, F. (2015). Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sugarcane. *Terra Latinoamericana*, 33(4), 321-330.. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792015000400321&lng=es&tlng=en.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). *Cadena agroindustrial de la panela*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). Accedido en junio, 2023 .
- Nadeem, S. J., Naveed, M., Ahmad, M. & Ahmad, Z. (2015). Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: Mechanisms of action, applications and future prospects. En N. Kumar Arora, *Plant microbes symbiosis: Applied facets* (1-36). Springer India.
- Ortega, E., Fernández, L., Ortega-Rodés, P. & Rodés R. (2009). *La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar*. [En línea]. La Habana: Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Consultado junio 2023. [http://www.uh.cu/... Ortega/...Ortega/](http://www.uh.cu/...Ortega/...Ortega/).
- Osorio, G. (2007). *Buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura en la producción de caña y panela*. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a1525s/a1525s00.htm>
- Sharma, I. P., Chandra, S. & Kumar, N. (2017). PGPR: Heart of Soil and Their Role in Soil Fertility. En S. Meena, P. Mishra, J. Bisht, & A. Pattanayak (eds.). *Agriculturally Important microbes for sustainable Agriculture*. 51-67. Springer.

- Sulistiono, W., Taryono, T., Yudono, P. & Irham, I. (2017). Early-Arbuscular Mycorrhizal Fungi-Application Improved Physiological Performances of Sugarcane Seedling and Further Growth in the Dry Land. *Journal of Agricultural Science*, 9(4), 95. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n4p95>
- Velasco-Velasco, J. (2014). Los biofertilizantes y la producción de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad*, 7(2), 60-64. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/516>
- Sulistiono, W. & Taryono, T. (2020). The Role of Mycorrhizae on Seedlings and Early Growth of Sugarcane. En *Mycorrhizal Fungi - Utilization in Agriculture and Forestry*. IntechOpen. United Kingdom. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94768>
- Juntahum, S., Jongrungklang, N., Kaewpradit, W., Lumyong, S. & Boonlue, S. (2020). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and productivity of sugarcane under field conditions. *Sugar Tech*, 22, 451-459. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00784-z>
- Wilches O., W. A. (2022). *Uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares en el cultivo de caña de azúcar para el mejoramiento de la calidad y rendimiento de panela en Suaita Santander* [tesis de maestría, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. Repositorio Institucional UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/49034>

BACTERIAS ASOCIADAS A MELIPONINOS Y SU POTENCIAL ENZIMÁTICO Y PROMOTOR DE CRECIMIENTO

Paulina Janneth Pérez Peralta¹, Ronald Ferrera Cerrato^{1*}, Alejandro Alarcón¹, Julián Delgadillo Martínez¹, Dulce Jazmín Hernández Melchor¹ y Ofelia Ferrera Rodríguez²

RESUMEN

Las bacterias son capaces de producir enzimas hidrolíticas con alto potencial metabólico, así como promover el crecimiento vegetal a través de mecanismos como la fijación de nitrógeno (N), la solubilización de fosfato y producción de auxinas, entre otros. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar de forma cualitativa la capacidad enzimática y de promoción de crecimiento de las cepas asociadas a las abejas sin aguijón (meliponinos). De las 33 cepas bacterianas provenientes de la miel, propóleo y polen de meliponinos, se observó que *Bacillus* sp. MD1, YM4, *B. kochii*, *Brevibacillus laterosporus*, MLS2, *B. inaquosorum* y *B. acidicola* fueron eficientes en todas las pruebas asociadas a la promoción de crecimiento y las cepas que destacaron en las pruebas enzimáticas fueron: *Bacillus* sp. MD1, GRF1, *Paenibacillus* sp., *B. subtilis*, *B. kochii*, *B. solani* y PLC1.1. Las cepas bacterianas asociadas a los meliponinos cuentan con potencial enzimático (lipolítico, amilolítico y celulolítico) que podría ser aprovechado por diversas industrias, asimismo, poseen la capacidad para promover el crecimiento vegetal, lo cual representa la base para el posterior estudio y desarrollo de biofertilizantes.

¹ Colegio de Posgraduados, Posgrado de Edafología, Carretera Federal México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México 56230. * ronaldfc@colpos.mx

² Instituto de Ecología, A. C. INECOL, Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, México 91073.

PALABRAS CLAVE

bacterias, meliponinos, *bacillus*, biofertilizantes, enzimas.

Introducción

Ante los desafíos globales de la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental, el uso de microorganismos surge como una alternativa en la nutrición y protección de las plantas mediante el desarrollo de biofertilizantes que, mediante mecanismos como la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de nutrientes como los fosfatos y la secreción de distintas hormonas promueven el crecimiento vegetal (O'Callaghan *et al.*, 2022).

De manera similar, diversas industrias se han interesado en explotar el potencial metabólico de enzimas extracelulares a partir de microorganismos (Munawar *et al.*, 2023). Tal es el caso de enzimas como las lipasas, amilasas y celulasas, las cuales catalizan la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga, carbohidratos complejos y celulosas, respectivamente (Jayasekara y Ratnayake, 2019; Singh *et al.*, 2022). Por lo que dichas enzimas poseen numerosas aplicaciones biotecnológicas en múltiples industrias como la alimentaria, la farmacéutica, papelera y biorrefinerías, entre otras (Adetunji y Olaniran, 2018; Ali *et al.*, 2023).

Con base en lo anterior y con el fin de conocer el potencial enzimático y de promoción de crecimiento de las cepas asociadas a las abejas sin aguijón, el objetivo de este capítulo fue evaluar *in vitro* la capacidad celulítica, amilolítica y lipolítica, así como de solubilizar fosfato, fijar nitrógeno y producir auxinas de los aislados microbianos.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron 33 cepas bacterianas asociadas al geopropóleo, miel y polen con y sin maduración de *Melipona beecheii* Bennett, 1835, donados por el Laboratorio de Bioprocesos, del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche.

Evaluación del potencial de promoción de crecimiento (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de auxinas) y actividad enzimática cualitativa

La capacidad de las cepas para fijar nitrógeno se analizó mediante la inoculación de cada una de las bacterias en medio semisólido NFB, libre de N (Dobereiner *et al.*, 1976), en placas con medio de cultivo Pikovskaya adicionado con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) para las solubilizadoras de fosfato y en tubos con medio líquido Luria-Bertani complementado con triptofano y en reacción con el reactivo Salkowski, para conocer las cepas productoras de auxinas (Bric *et al.*, 1991).

La capacidad lipolítica se efectuó en placas con medio de cultivo adicionado con Tween 20 (Sierra, 1957); para conocer la actividad amilolítica se inocularon las bacterias en placas con medio agar nutritivo (AN) adicionado con 0.2% de almidón soluble (Society of American Bacteriologist, 1951); y la capacidad celulolítica se evaluó en placas con un medio especial acondicionado con solución salina de Winogradski, nitrato de amonio, solución de micronutrientes y adicionado con carboximetilcelulosa (Corlay L., 1997).

Resultados y discusión

En relación con las pruebas de promoción de crecimiento de las cepas bacterianas asociadas a las abejas sin aguijón, la fijación de N se presentó en 20 de las 33 cepas (Cuadro 1). La actividad de *B. firmus*, *B. altitudinis*, *B. megaterium* y *B. xiamenensis* (Cuadro 1) ha sido corroborada en diversos estudios donde, además de promover el crecimiento vegetal, han generado tolerancia a diferentes tipos de estrés (osmótico, hídrico, temperatura y metales potencialmente tóxicos) y mejorado la respuesta fisiológica de la planta (clorofila, intercambio de gases y enzimas antioxidantes) (El-Esawi *et al.*, 2018; Mera *et al.*, 2023).

La capacidad de solubilización de fosfato se presentó en 18 cepas (Cuadro 1), de las cuales la mayoría tiene una referencia en la literatura y cuyos aislamientos han procedido de la rizosfera y diferentes órganos vegetales, entre los que destaca el género *Bacillus* (Kalayu, 2019). Por

ejemplo, *B. tequilensis* y *B. subtilis* también han sido reportadas como solubilizadoras de fosfato, a partir de aislamientos de la raíz, tallo y hojas de *Rehmannia glutinosa* Libosch (Wang *et al.*, 2020). Asimismo, *Oerskovia* sp. es de los géneros más frecuentes en la rizosfera de los “frailejones” (*Espeletia grandiflora*) del páramo colombiano (Roa-Angulo y Forero-Jiménez, 2021).

De manera similar, *B. aerophilus*, proveniente de un humedal brasileño, se ha sugerido como candidata para promover el crecimiento, al ser eficiente para solubilizar fosfato *in vitro* (Jankoski *et al.*, 2023). Especies como *B. megaterium*, *B. inaquosorum*, *Oerskovia* sp. y *Brevibacillus laterosporus* son componentes de algunos biofertilizantes y han logrado satisfacer las necesidades energéticas de las plantas (Raimi *et al.*, 2020; Wickramasinghe *et al.*, 2023). La inoculación de *Alcaligenes* sp. destaca en la promoción del crecimiento vegetal de leguminosas al generar resultados equiparables a los tratamientos con incorporación de 300-400 kg ha⁻¹ de roca fosfórica (Ullah *et al.*, 2023).

En cuanto a las fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal, 15 de las 33 cepas asociadas a los meliponinos produjeron auxinas (Cuadro 1). La inoculación de cepas del género *Bacillus* aumenta el contenido de triptófano en los exudados de la raíz, componente esencial para la síntesis de ácido indolacético (AIA), por lo que estimulan el crecimiento de la planta mediante la inducción de la división celular (Wang *et al.*, 2021; Lalanne-Tisné *et al.*, 2023).

No obstante, debe indagarse más acerca de aquellas especies que fueron positivas en diversas pruebas y no tienen reportes acerca de sus capacidades en la promoción del crecimiento vegetal, tal es el caso de *B. kochii*, *B. acidicola*, *B. solani* y *P. medicaginis* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Evaluación de la capacidad de las bacterias asociadas a meliponinos para la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de auxinas

Cepas	Solubilización de fosfato	Fijación de nitrógeno	Producción de auxinas
1 <i>Bacillus</i> sp. MD1	+	+	+
2 <i>Bacillus megaterium</i>	+	+	-
3 GRF1	+	-	+
4 <i>Paenibacillus</i> sp.	-	-	-

5	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-
6	YM4	+	+	+
7	<i>Bacillus kochii</i>	+	+	-
8	<i>Bacillus solani</i>	+	-	+
9	<i>Bacillus endophyticus</i> MLS4	-	-	-
10	<i>Brevibacterium</i> sp.	+	-	-
11	<i>Bacillus xiamenensis</i>	-	+	-
12	<i>Bacillus safensis</i>	-	+	-
13	<i>Bacillus flexus</i>	-	-	+
14	<i>Bacillus firmus</i>	-	+	-
15	<i>Bacillus endophyticus</i> MLC1	-	-	+
16	<i>Terribacillus goriensis</i>	-	+	-
17	<i>Alcaligenes</i> sp.	+	-	-
18	<i>Bacillus aerophilus</i>	+	+	-
19	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	+	+	+
20	<i>Bacillus sonorensis</i>	-	+	+
21	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	-	+	-
22	<i>Paenibacillus medicaginis</i>	-	-	+
23	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	+	-
24	MCS27.2	+	-	+
25	MLS2	+	+	+
26	<i>Bacillus inaquosorum</i>	+	+	+
27	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	+	-
28	<i>Oerskovia</i> sp.	+	-	-
29	<i>Bacillus acidicola</i>	+	+	+
30	PEC6	+	-	-
31	PES1.2	-	+	+
32	PLC1.1	-	+	-
33	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-

+ reacción positiva, - reacción negativa

En relación con la capacidad enzimática, 12 de las 33 cepas bacterianas caracterizadas presentaron capacidad lipolítica (Cuadro 2). *Bacillus* sp. es uno de los géneros productores de lipasas más representativos, entre los que destacan *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. licheniformis* (Adetunji y Olaniran, 2018; Ali *et al.*, 2023), lo cual coincide con nuestros resultados (Cuadro 2).

Debido a la alta disponibilidad y rápida tasa de crecimiento en una amplia gama de condiciones físicas y químicas, la fuente de enzimas de origen bacteriano se usa preferiblemente; en el caso de la producción de las amilasas no es la excepción, ya que resulta un proceso más económico, eficiente y con mayores rendimientos (Singh *et al.*, 2022). *Bacillus sonorensis*, *B. megaterium*, *B. endophytica*, *Paenibacillus* sp., *B. kochii*, *Terribacillus goriensis*, *Oerskovia* sp. son algunas de las bacterias asociadas a meliponinos con capacidad amilolítica (Cuadro 2), la cual se corrobora en la literatura, donde además exhiben propiedades como termoalcalófilas y psicrófilas (Chattopadhyay *et al.*, 2013; Elyasi Far *et al.*, 2020; Vyas *et al.*, 2019).

Respecto a la capacidad celulolítica, 19 cepas fueron eficientes (Cuadro 2). *B. inaquosorum* se reconoce como una cepa capaz de generar altos rendimientos en la producción de endoglucanasas, principales participantes en la escisión de la celulosa (Srivastava *et al.*, 2022). La actividad celulítica de *B. subtilis* y *B. tequilensis* ha sido comprobada (Harba *et al.*, 2022; Kurniawan & Gusmawartati, 2021), así como el potencial de *Paenibacillus* sp. en la gestión de residuos agrícolas (Danu *et al.*, 2023) y la participación de *B. sonorensis* en la producción de biocombustibles a partir del tratamiento de biomasa agrícola (Souii *et al.*, 2022).

Entre las cepas que presentaron respuesta positiva en las tres pruebas enzimáticas destacan: *Bacillus* sp. MD1, GRF1, *Paenibacillus* sp., *B. subtilis* y *B. kochii* y PLC1.1 (Cuadro 2). Al respecto, *B. subtilis* es una de las fuentes bacterianas que se usan preferiblemente en la producción de α -amilasas (Singh *et al.*, 2022), mientras *Paenibacillus* sp. es considerado un buen prospecto en la gestión de residuos agrícolas y efectivo en procesos de biodegradación del licor negro (subproducto del proceso Kraft) (Danu *et al.*, 2023; Mathews *et al.*, 2014) y *B. kochii* (*Cytobacillus Kochii*) ha sido eficiente en el mejoramiento de productos como el tabaco y su aroma (Wu *et al.*, 2023); sin embargo, aún hay un amplio campo por explorar.

Cuadro 2. Evaluación de la actividad enzimática cualitativa de bacterias asociadas a meliponinos

	Cepas	Lipolítica	Amilolítica	Celulolítica
1	<i>Bacillus</i> sp. MD1	+	+	+
2	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	-
3	GRF1	+	+	+
4	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	+	+
5	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
6	YM4	+	-	-
7	<i>Bacillus kochii</i>	+	+	+
8	<i>Bacillus solani</i>	+	-	+
9	<i>Bacillus endophyticus</i> MLS4	-	+	+
10	<i>Brevibacterium</i> sp.	-	-	-
11	<i>Bacillus xiamenensis</i>	-	+	-
12	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	+
13	<i>Bacillus flexus</i>	-	+	+
14	<i>Bacillus firmus</i>	-	+	-
15	<i>Bacillus endophyticus</i> MLC1	-	-	-
16	<i>Terribacillus goriensis</i>	-	+	+
17	<i>Alcaligenes</i> sp.	-	-	-
18	<i>Bacillus aerophilus</i>	-	-	-
19	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	-	-	-
20	<i>Bacillus sonorensis</i>	-	+	+
21	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	+	-	+
22	<i>Paenibacillus medicaginis</i>	-	-	-
23	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	+
24	MCS27.2	-	-	-
25	MLS2	+	+	-
26	<i>Bacillus inaquosorum</i>	+	-	+
27	<i>Bacillus tequilensis</i>	-	+	+
28	<i>Oerskovia</i> sp.	-	+	+
29	<i>Bacillus acidicola</i>	-	-	+
30	PEC6	+	-	-
31	PES1.2	-	-	+
32	PLC1.1	+	+	+
33	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-

+ reacción positiva, - reacción negativa

Conclusiones

Las cepas bacterianas asociadas a los meliponinos poseen capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato y producir auxinas, propiedades asociadas a la promoción del crecimiento vegetal. Asimismo, presentaron actividad enzimática lipolítica, amilolítica y celulolítica.

Este tipo de conocimiento representa la base para el desarrollo de inoculantes microbianos o biofertilizantes capaces de mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos. De igual manera, la capacidad enzimática de las cepas bacterianas asociadas a las abejas sin aguijón podría ser aprovechada por diversas industrias y participar en procesos como el compostaje de residuos sólidos, el tratamiento de efluentes residuales e incluso la producción de biocombustibles, entre otros.

Agradecimientos

Cepas donadas por la Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz del Laboratorio de Bioprocesos, CONACYT–Colegio de Postgraduados, Campus Campeche.

Apoyo otorgado a través de Beca Nacional para Estudios de Posgrado CONACYT.

Referencias

- Adetunji, A. I. y Olaniran, A. O. (2018). Optimization of culture conditions for enhanced lipase production by an indigenous *Bacillus aryabhattai* SE3-PB using response surface methodology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(6), 1514-1526. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1514985>
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., y Lee, I.-J. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
- Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on

- a nitrocellulose membrane. *Applied and environmental Microbiology*, 57(2), 535-538.
- Chattopadhyay, A. N., Singh, P., Dey, A., Roy, P., Chatterjee, S., Saha, P., & Mukhopadhyay, S. K. (2013). Study of a psychrotolerant amyolytic *Paenibacillus* sp. isolated from Arctic region. *J Microbiol Biotechnol Res*, 3(4), 24-31.
- Corlay L. (1997). *Cinética microbiana del proceso de producción de vermicomposta* [tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. Montecillo, Edo. de México.
- Danu, N., Paschapur, A., Subbanna A., Stanley, J., Singh, A. K., Bisht, I. & Gupta, J. P. (2023). Molecular characterization and estimation of cellulolytic potential of gut bacteria isolated from four white grub species native to Indian Himalayas. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 26(1), 102036. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.102036>
- Dobereiner, J., Marriel, I. E., & Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(10), 1464-1473
- El-Esawi, M. A., Alaraidh, I. A., Alsahli, A. A., Alamri, S. A., Ali, H. M., & Alayafi, A. A. (2018). *Bacillus firmus* (SW5) augments salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating root system architecture, antioxidant defense systems and stress-responsive genes expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.026>
- Elyasi Far, B., Dilmaghani, A. & Yari Khosroushahi, A. (2020). In silico study and optimization of *Bacillus megaterium* alpha-amylases production obtained from honey sources. *Current Microbiology*, 77, 2593-2601.
- Jankoski, P. R., Bach, E., Bald, D. R. Q., Passaglia, L. M. P., Carvalho, J. B., Oliveira, R. R., Pine Omori, W. & da Motta, A. S. (2023). *Prospecting the functional potential of Bacillus altitudinis 1.4 isolated from sediment in association with Bradyrhizobium japonicum* [preprint]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2700588/v1>
- Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*, 22, 92.

- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Kurniawan, C. A. & Gusmawartati. (2021). Effectiveness Of Various Cellulolytic Bacteria Isolates As The Decomposers In Composting Oil Pal Emmpty Fruit Bunches. *Metamorfosa:Journal of Biological Sciences*, 8(2), 253-259.
- Lalanne-Tisné, G., Barral, B., Taibi, A., Coulibaly, Z. K., Burguet, P., Rasoarahona, F., Quinton, L., Meile, J. C., Boubakri, H. & Kodja, H. (2023). Exploring the phytobeneficial and biocontrol capacities of endophytic bacteria isolated from hybrid vanilla pods. *bioRxiv*, 529991. <https://doi.org/10.1101/2023.02.24.529991>
- Mathews, S. L., Pawlak, J. J., & Grunden, A. M. (2014). Isolation of *Paenibacillus glucanolyticus* from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste. *Bioresource technology*, 164, 100-105.
- Mera, L. D. P., Yamashita, O. M., Vicentin, R. P., Ferreira, A., Rossi, A. A., Carvalho, M. A. y Dallacort, R. (2023). Efficiency and diversity of nitrogen fixing bacteria colonizing *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. *African Journal of Agricultural Research*, 19(4), 444-454. <https://doi.org/10.5897 /AJAR 2023.16312>
- Munawar, A., Shaheen, M., Ramzan, S., Masih, S. A., Jabeen, F., Younis, T., & Aslam, M. (2023). Diversity and enzymatic potential of indigenous bacteria from unexplored contaminated soils in Faisalabad. *Helijon*, 9(4).
- O'Callaghan, M., Ballard, R. A. & Wright, D. (2022). Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil Use and Management*, 38(3), 1340-1369. <https://doi.org/10.1111/sum.12811>
- Raimi, A., Roopnarain, A., Chirima, G. J., y Adeleke, R. (2020). Insights into the microbial composition and potential efficiency of selected commercial biofertilisers. *Helijon*, 6(7), e04342.
- Roa-Angulo, V., & Forero-Jiménez, A. (2021). Study of the behavior of Cellulolytic microorganisms and Phosphate solubilizers associated with Rhizospheric soil of *Espeletia grandiflora* in two

- zones with different degree of intervention in Páramo Ocetá, Colombia. *Indian Journal of Science and Technology*, 14(7), 665-675.
- Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on the influence on the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23, 15-22.
- Singh, R., Kim, S. K., Kumari, K. & Mehta, P. K. (2022). An Overview of Microbial α -amylase and Recent Biotechnological Developments. *Current Biotechnology*, 11, 11-26. <https://doi.org/10.2174/2211550111666220328141044>
- Society of American Bacteriologist. (1951). *Manual of methods for pure culture study of bacteria*. Mc Graw-Hill, New York.
- Souii, A., Guesmi, A., Ouertani, R., Cherif, H., Chouchane, H., Cherif, A. & Neifar, M. (2022). Carboxymethyl Cellulase Production by Extremotolerant Bacteria in Low-Cost Media and Application in Enzymatic Saccharification of Stevia Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 2111–2122.
- Srivastava, J., Mal, J., Verma, M., Singh, S., & Sinha, R. (2022). In silico investigation of endoglucanase produced by *Bacillus inaquosorum* KCTC 13429 for valorisation of lignocellulosic biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.
- Ullah, M., Daur, I., Khan, B., Mehran Anjum, M., & Ali, N. (2023). Rock Phosphate and Phosphorus Solubilizing Bacteria Effect on Yield and Yield Components of Chickpea. *Gesunde Pflanzen*, 1-10.
- Vyas, G., Sharma, N., & Sharma, N. (2019). Purification and Characterization of α -amylase from a Novel Thermoalkalophilic Strain of *Bacillus sonorensis* GV2 Isolated from Mushroom Compost. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 19(3), 1–14. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2019/v19i330111>
- Wang, S., Ji, B., Su, X., Li, H., Dong, C., Chen, S., ... & Feng, W. (2020). Isolation of endophytic bacteria from *Rehmannia glutinosa* Libosch and their potential to promote plant growth. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 66(5), 279-288.
- Wang, S., Na, X., Yang, L. Liang, C., He, L., Jin, J., Liu, Z., Qin, J., Li, J., Wang, X. & Biet, Y. (2021). *Bacillus megaterium* strain

- WW1211 promotes plant growth and lateral root initiation via regulation of auxin biosynthesis and redistribution. *Plant Soil*, 466, 491–504. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05055-z>
- Wickramasinghe, W. R. K. D. W. K. V., Giriya, D. & Gopal, K. S. (2021). Native Multiphasic Plant Growth Promoting Rhizobacteria Consortia for Growth and Yield of Rice. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), 601–606.
- Wu, X., Cai, W., Zhu, P., Peng, Z., Zheng, T., Li, D., Li, J., Zhou, G., Zhang, J. & Du, G. (2023). Function-driven design of *Bacillus kochii* and *Filobasidium magnum* co-culture to improve quality of flue-cured tobacco. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1024005. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1024005>
- Zhang, X. J., Wang, L. Wang, S., Chen, Z. L. y Li, Y. H. (2021). Contributions and characteristics of two bifunctional GH43 β -xylosidase / α -L arabinofuranosidases with different structures on the xylan degradation of *Paenibacillus physcomitrella* strain XB. *Microbiological Research*, 253, 126886. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126886>

CONTROL BIOLÓGICO DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *ALTERNARIA* Y *FUSARIUM* CON *BACILLUS SUBTILIS* Y *BACILLUS PUMILUS* *IN VITRO* E *IN VIVO* EN PLANTAS DE JITOMATE CHERRY

Dinorah Valdez Rodríguez¹, Paula García Pedroza¹, Judith Vázquez Hernández¹, Luis Eduardo Segura García², Manuel Reinhart Kirchmayr³, David José Mendoza Aguayo¹ y Alejandro Arana Sánchez^{1*}

RESUMEN

Los hongos fitopatógenos provocan enfermedades que demeritan la calidad de los cultivos ocasionando grandes pérdidas económicas. Entre ellos se encuentran los géneros *Fusarium* y *Alternaria*; para contrarrestarlos han surgido técnicas como el control biológico, donde las bacterias del género *Bacillus* resaltan debido a su capacidad de promover el crecimiento de los cultivos y de protegerlos frente a fitopatógenos. El objetivo del presente estudio fue el análisis *in vitro* e *in vivo* de las cepas *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* como agentes de biocontrol frente a fitopatógenos en plantas de jitomate Cherry. La aplicación de *B. subtilis* y su combinación con *B. pumilus* demostraron ejercer control biológico y propiedades bioestimulantes en el crecimiento de las plantas. Así mismo, se obtuvieron mejores resultados en tratamientos preventivos que en correctivos.

PALABRAS CLAVE

Biocontrol, bioestimulante, fitopatógenos, *bacillus*, jitomate.

¹ ITESO, Anillo Perif. Sur Manuel Gómez Morín 8585, San Pedro Tlaquepaque, Jal. C.P. 45604. *aarana@iteso.mx

² CUCBA-UdeG, Cam. Ramón Padilla Sánchez 2100, Las Agujas, Zapopan, Jal. C.P. 45200.

³ CIATEJ, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45019.

Introducción

La importancia de la agricultura en México se relaciona con el escenario económico, ambiental y social. En 2020, cerca de 21.6 millones de hectáreas fueron destinadas a actividades agropecuarias, registrando una derrama económica en el campo superior a 1.2 billones de pesos (CEDRRA, 2020; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021). A pesar de su relevancia, este sector enfrenta diversas problemáticas, como la disminución del rendimiento de los cultivos debido a enfermedades en las plantas ocasionadas principalmente por agentes fitopatógenos y malezas, afectando del 20 al 40% de la productividad general en el campo (Zepeda, 2018). Los hongos fitopatógenos han sido objeto de investigación debido a las afectaciones que generan; un ejemplo de esto son las mermas causadas por *Fusarium* de hasta un 60% y por *Alternaria* de un 20 a 30% en cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Martínez-Ruíz *et al.*, 2016).

Se han desarrollado estrategias para controlar las enfermedades causadas por hongos, como los fungicidas sintéticos; no obstante, su uso ha implicado resistencia, daños en la salud y afectaciones ambientales (Torres *et al.*, 2022). Por lo tanto, la búsqueda de alternativas sustentables y ecológicas se ha vuelto una prioridad. Entre estas surgió el biocontrol, que consiste en el uso de microorganismos que naturalmente se encuentran asociados a los cultivos, son promotores del crecimiento vegetal y presentan comportamiento antagónico contra diferentes fitopatógenos que atacan al hospedero (Cárdenas *et al.*, 2021). Las bacterias del género *Bacillus* se han reportado como agentes útiles para el biocontrol en cultivos. Especies como *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* han mostrado en diversos estudios actividades biocontroladoras frente a *Fusarium* y *Alternaria* (Rojas, 2020). La investigación de Muhammad & usa (2003), donde se estudió el antagonismo *in vitro* de microorganismos, incluido *B. subtilis*, en compostas con diferentes composiciones frente a diversos fitopatógenos, incluyendo a *Fusarium oxysporum*, obtuvo como resultado halos de inhibición de hasta un 62.2% en el crecimiento de *Fusarium*. Asimismo, en el estudio de Awan & Shoaib (2019) el efecto de *B. subtilis* se probó en plantas

de jitomate, mostrando que la aplicación foliar de *B. subtilis* sola y en combinación con diferentes nutrientes combatieron significativamente la enfermedad temprana del tizón de jitomate provocada por *Alternaria solani* en un 67 a 83%. En cuanto a estudios *in vitro*, en lo que respecta a *B. pumilus*, en el trabajo presentado por Tozlu *et al.* (2018) se evaluó la cepa *B. pumilus* TV 67 contra dos aislados de *Alternaria alternata* provenientes de fresa y pepino resultando en porcentajes de tasa de inhibición de 65.89% al 87.63%.

El objetivo del presente estudio fue realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* de *B. subtilis* y *B. pumilus* frente a los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Fusarium*, así como evaluar su capacidad bioestimulante en plantas de jitomate Cherry.

Metodología

Preparación de medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias benéficas y hongos fitopatógenos. El medio YPD se compuso de dextrosa 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L y peptona 20 g/L. Se usó caldo nutritivo formulado (8 g/L) y los antagonismos fueron realizados en medio PDA formulado (39 g/L) compuesto por dextrosa (20 g/L), agar (15 g/L) y almidón de papa (4 g/L). Para medios sólidos se añadieron 15 g/L de agar.

Reactivación de microorganismos

Los fitopatógenos *Alternaria* y *Fusarium* se adquirieron del cepario del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CU-CBA) y las bacterias *B. subtilis* y *B. pumilus* del cepario del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO). Estas fueron aisladas a partir del suelo de cultivos de tomate y chile serrano e identificadas taxonómicamente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en un equipo MICROFLEX LT, generando los espectros con el método FC.par en el software FlexControl 4.1

y comparándolos en el software MALDI Biotyper 4.1 contra la base de datos BDAL v.10. Tanto el aislamiento como la identificación taxonómica fueron realizados en estudios previos de ambas instituciones. Los viales criopreservados se descongelaron gradualmente hasta temperatura ambiente. Se inoculó 1 mL del criovial en 9 mL de medio líquido YPD y se incubó por 48 horas, a 150 rpm y 36°C. Mostrados signos de crecimiento se sembraron en YPD agar por estriado y se incubaron a 36°C por 24 horas.

Antagonismos de cepas biocontrol con hongos *in vitro*

Se evaluó la inhibición de crecimiento de *Fusarium* y *Alternaria* por efecto de *B. subtilis* y *B. pumilus* en medio PDA. El esquema de enfrentamiento basado en la metodología descrita por Anith *et al.* (2021) consistió en colocar el hongo por punción al centro de la caja Petri e inocular ambas cepas bacterianas con una línea de manera perpendicular formando una cruz, evitando pasar por el inóculo de hongo, permitiendo así evaluar el efecto individual de cada bacteria, así como su efecto sinérgico frente a los fitopatógenos.

Antagonismos de cepas biocontrol con hongos *in vivo*

Se utilizaron *B. subtilis*, *B. pumilus* y su combinación frente a los fitopatógenos *Alternaria* y *Fusarium* en plantas en estado vegetativo. El experimento constó de dos tratamientos: correctivo, inoculando la bacteria biocontroladora siete días después del fitopatógeno (Fortino, 2017); y preventivo, inoculando al fitopatógeno 10 días después de la bacteria (Ruiz *et al.*, 2020).

El sustrato consistió en 40% de estopa de coco, 40% de composta y 20% de perlita. Las soluciones de microorganismos a inocular se prepararon en diluyente de peptona (1 g/L) (CDS, 2009). La concentración de bacteria inoculada fue de 8×10^8 cel/mL y la densidad de esporas de los fitopatógenos inoculados fue de 1×10^5 esporas/mL. Se inocularon en ambos casos 10 mL de solución a cada planta (Coromoto, 2018), las bacterias bajo la técnica de riego en el sus-

trato, y los fitopatógenos mediante aspersión al follaje (Mairesse *et al.*, 2018). Previamente se realizaron pequeños cortes con bisturí en los tallos para asegurar la infección (Pomar, 2000). La duración del experimento fue de 39 días.

Las variables de respuesta fueron: peso seco folicular, longitud apical y porcentaje de supervivencia. La longitud apical se midió antes y después del experimento y se determinó desde la base hasta el meristemo apical. El peso seco folicular se determinó introduciendo la sección foliar de la planta en un horno de secado a 70°C durante 24 h. Invernadero propuesto

El diseño del invernadero para los experimentos in vivo se basó en la estructura de “Caterpillar tunnel”. Para la cobertura se usó malla sombra al 50% de transmisión de luz (Hernández, 2011). Se colocó una planta por maceta, se separaron los tratamientos con películas de plástico para evitar contaminación cruzada (Figura 1).

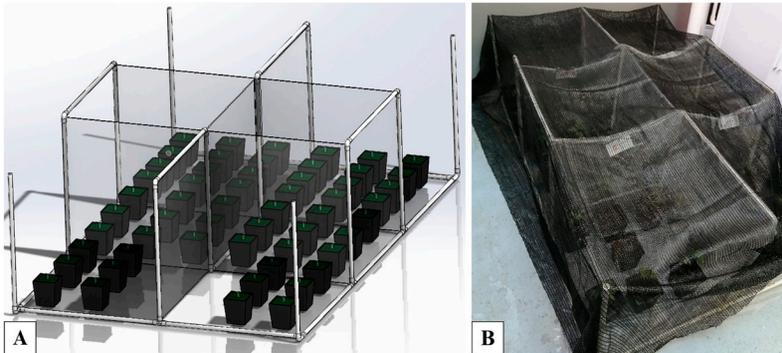


Figura 1. Diseño del invernadero A) Modelo computarizado y B) en uso con malla sombra

Resultados y discusión

Antagonismos de cepas biocontrol con hongos *in vitro*

Se manifestó visualmente un efecto antagónico; *B. subtilis* y *B. pumilus* ejercieron una inhibición del crecimiento de *Fusarium* y *Alternaria* (Figura 2). Un fenómeno similar se presentó en la investigación publicada por Anith *et al.* (2021), en donde el crecimiento de *Fusarium oxysporum* se encuentra limitado por la bacteria del género *Bacillus*.

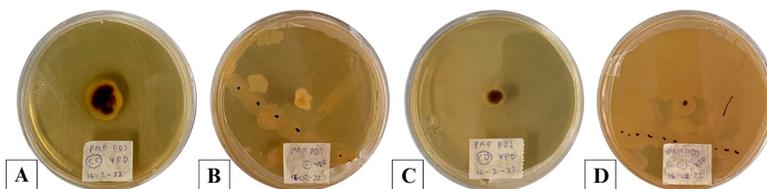


Figura 2. Enfrentamientos *in vitro* A) Control de *Fusarium*, B) Inhibición de *Fusarium* por *B. pumilus* y *B. subtilis*, C) Control de *Alternaria*, D) Inhibición de *Alternaria* por *B. pumilus* y *B. subtilis*

Antagonismos de cepas biocontrol con hongos *in vivo*

Un mes después de la primera inoculación se documentaron observaciones cualitativas de las plantas. Se identificaron los signos de infección de los fitopatógenos, mostrando manchas y decoloraciones en las hojas (Figura 3).

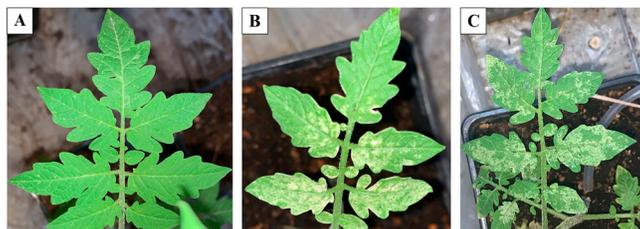


Figura 3. Comparación de características foliares de plantas A) Control e infectadas con B) *Alternaria* o C) *Fusarium*

Los síntomas de infección por hongo *Alternaria* se manifiestan principalmente con manchas en las hojas de las plantas de jitomate (Alcedo *et al.*, 2018). Los hongos del género *Fusarium* son responsables del marchitamiento vascular como síntoma de enfermedad, mismo que fue observado durante la experimentación (García *et al.*, 2019).

Con el uso de StatGraphics 18-X64 se analizaron las variables de respuesta mencionadas en la metodología mediante un ANOVA multifactorial usando el análisis Tukey al 95 % para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. De las 54 plantas, sólo 35 fueron analizadas debido a que las restantes murieron a causa de la manipulación en su traspaso al invernadero o por efecto de los fitopatógenos.

Analizando el índice de supervivencia, los fitopatógenos *Fusarium* y *Alternaria* fueron estadísticamente igual de letales (Figura 4A). Por otra parte, un mayor número de plantas sobrevivieron en el tratamiento preventivo que en el correctivo, tomando en cuenta los resultados de ambos fitopatógenos y las distintas aplicaciones de bacterias biocontroladoras (*B. subtilis*, *B. pumilus* y la sinergia de estas) (Figura 4B), mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. Esto concuerda con lo presentado por Mondino y Vero (2006), donde se menciona que en las investigaciones de control biológico se suele tener efecto cuando los antagonistas son inoculados anteriormente o junto con el fitopatógeno, pero no posteriormente, demostrando así el carácter preventivo del tratamiento. En cuanto a los mecanismos de antagonismo, la investigación realizada por Ruiz *et al.* (2014) hace referencia a la capacidad de las bacterias del género *Bacillus* para producir metabolitos con actividad antibiótica y enzimas líticas generando un efecto de competencia. En este sentido, resulta benéfico su potencial para colonizar la rizósfera de las plantas (Rai & Nabti, 2017). Siendo posible brindar a las plantas un mecanismo de defensa, cuya aplicación sea más efectiva antes de la infección con los fitopatógenos propiciando los efectos de un tratamiento preventivo.

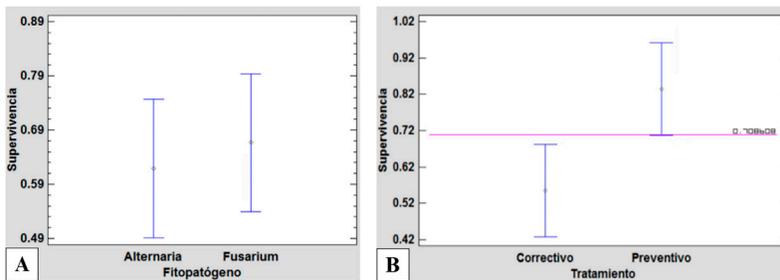


Figura 4. Intervalos al 95% de Tukey del porcentaje de supervivencia con respecto a las plantas de cada tratamiento A) fitopatógeno inoculado y B) tipo de tratamiento

Todas las variables de respuesta de los tratamientos preventivos y correctivos se compararon con los controles (Figura 5): combinación de bacterias *B. subtilis* y *B. pumilus* sin infectar (CAmbas), infectada con *Fusarium* (CFusarium) sin cepas benéficas, sin inoculación ni infección (Cninguno) e inoculada con *B. subtilis* (CSubtilis) sin infección. No se tomó en cuenta el control *Alternaria* ni el control de *Pumilus* debido a que las plantas murieron antes de la recolección de datos. Se atribuye la muerte del control de *Alternaria* al avance de la enfermedad en las plantas, y la muerte del control de *B. pumilus* a la manipulación en el trasaso al invernadero, ya que los tratamientos preventivos y correctivos con esta bacteria sí llegaron a la culminación del experimento; se esperaba que este control tuviera un comportamiento similar al control de *B. subtilis* al ser también una bacteria fitobenéfica.

Se observó mayor crecimiento de longitud apical en el tratamiento preventivo que en el correctivo, el cual resultó estadísticamente igual al control de *Fusarium*, por lo que las bacterias no fueron capaces de promover el crecimiento de las plantas ya enfermas.

El control de *B. subtilis* y de Cambas fue estadísticamente igual, evidenciando una mayor longitud apical con estos tratamientos a comparación de las plantas infectadas con *Fusarium*. El control de *B. subtilis* presentó un mayor crecimiento que los tratamientos correctivo y preventivo debido posiblemente a su efecto bioestimulante en las plantas.

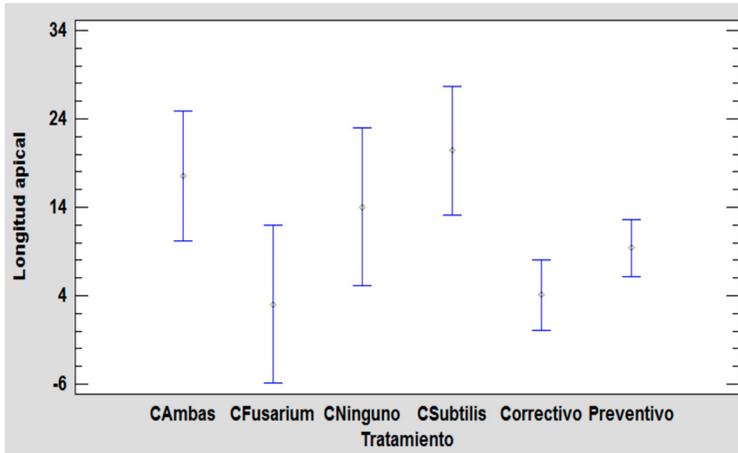


Figura 5. Intervalos al 95% de Tukey de la longitud apical en cm con respecto a los controles y los tratamientos

El siguiente análisis comparó el peso seco foliar de los tratamientos con los fitopatógenos frente a los controles: plantas infectadas en los tratamientos correctivos y preventivos con *Alternaria* o con *Fusarium*, los controles de fitopatógeno (CFusarium), controles de bacteria (CSubtilis y CAmbras) y sin ningún tratamiento (CNinguno). Las plantas infectadas con fitopatógenos presentaron un menor crecimiento foliar a las no infectadas debido a la progresión de la enfermedad. La inoculación con *B. subtilis* en las plantas control aumentaron el crecimiento foliar comparado con la planta sin inoculación, evidenciando el efecto bioestimulador de dicha bacteria en lo que respecta a la ganancia de biomasa denotada por la prueba de peso seco foliar (Figura 6).

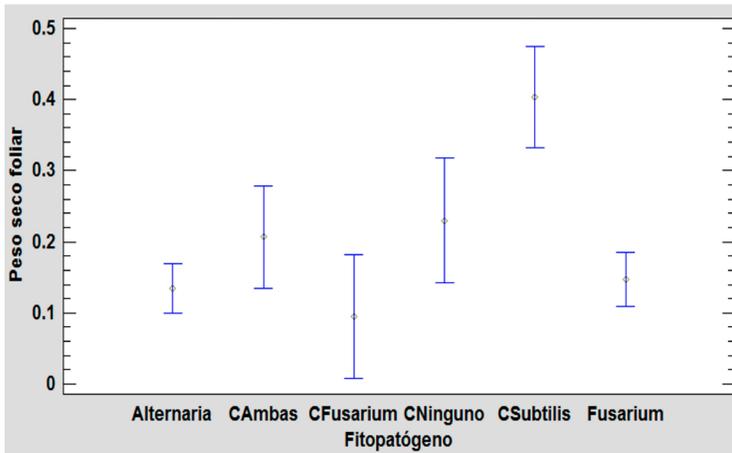


Figura 6. Intervalos al 95% de Tukey con respecto a los hongos, de factores: a) preso fresco, b) longitud apical, c) peso seco radicular, d) peso seco foliar

Esto se asemeja con lo presentado por Airola (2010), donde se menciona que especies de *Bacillus* en condiciones *in vivo* son promotoras de crecimiento de biomasa. El efecto promotor de crecimiento que ejercen las especies de *Bacillus* en las plantas es causado por el aumento de disponibilidad de nutrientes, dada la intervención de dichos microorganismos en el ciclo biogeoquímico de ciertos nutrientes. En la investigación realizada por Airola (2010) se realizaron ensayos *in vivo* con *Bacillus subtilis* como aditivo, con plántulas de jitomate en condiciones de invernadero. Se presentó un mayor peso seco foliar en un tratamiento compuesto por un aislado de *Bacillus* spp.

Conclusiones

Las pruebas de antagonismo *in vitro* permitieron apreciar de manera cualitativa la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos gracias a las bacterias. En la experimentación *in vivo*, la cepa *B. subtilis* y su combinación con *B. pumilus* demostraron ejercer biocontrol hacia el desarrollo de los fitopatógenos, además de posibles propie-

dades bioestimulantes en el desarrollo de las plantas de jitomate; por el contrario, no se logró demostrar el potencial biocontrolador y bioestimulante de *B. pumilus* sola en los tratamientos *in vivo*, se sugiere seguir investigando su uso en el campo ya que *in vitro* sí demostró un comportamiento antagónico.

El crecimiento foliar se ve mermado tras la infección con hongos fitopatógenos, efecto contrario al ocurrido por la inoculación con las bacterias. Por otra parte, se presenta un mayor índice de supervivencia cuando el tratamiento es preventivo, sobre todo con el uso de *B. subtilis*, cepa que demostró mayor capacidad de bioestimulación a comparación de *B. pumilus*. La capacidad de las bacterias del género *Bacillus* de atenuar la infección fúngica resulta un escenario de utilidad para el desarrollo de cultivos resistentes a signos de enfermedad por el efecto de hongos fitopatógenos de gran incidencia en cultivos de jitomate. Lo anterior demuestra el potencial biocontrolador de las cepas estudiadas y promueve su posterior uso a nivel comercial en el campo mexicano.

Agradecimientos

Agradecemos al Fondo de Apoyo a la Investigación FAI (Fondo de Apoyo a la Investigación) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO) por el financiamiento al proyecto.

Referencias

- Airola, V. (2010). *Compostas líquidas con bacterias promotoras de crecimiento en la nutrición de tomate (Solanum lycopersicum)*. Instituto Politécnico Nacional.
- Alcedo, Y. & Reyes, I. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro*. 30(1). 59-66. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100006&lng=es&tlng=es.

- Anith, K., Nysanth, N. & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 229-236. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33948964/>
- Awan, Z. A., & Shoaib, A. (2019). Combating early blight infection by employing bacillus subtilis in combination with plant fertilizers. *Current Plant Biology*, 20, 100125. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100125>
- Cárdenas, C., Molina, L., Cancino, G., De los Santos, S., Anaya, E., Díaz, I. & Ramírez, S. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(5), 899-913.
- Casos, M. & Casos, N. (2017). *Caracterización de especies de Bacillus aisladas de rizoplano y rizósfera de Asparagus officinalis L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas* [tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio Institucional UNPRG. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/1129/BC-TES-5909.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2009). *Medios, reactivos y control de calidad*. Medigraphic. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl0911-12d.pdf>
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. (2020). *Situación Del Sector Agropecuario En México*. CEDRSSA. http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/22Situacion_Sector_Agropecuario_Me%CC%81xico.pdf
- Coromoto, Y. & Reyes, I. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro*, 30(1), 59-66. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100006
- Espinoza, C., Gallegos, G., Ochoa, Y., Hernández, F., Méndez, R. & Rodríguez, R. (2019). Antagonistas microbianos para biocontrol de la marchitez y su efecto promotor en el rendimiento de chile serrano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(23), 187-197.

- Fortino, H. (2017). *Uso de Trichoderma asperelloides Y Bacillus licheniformis para el biocontrol de Fusarium oxysporum Y Alternaria alternata en plantas de jitomate (Solanum lycopersicum)* [tesis de maestría, Universidad Tecnológica de la Mixteca]. http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/13132.pdf
- García, D., Marín, V., & Reyes, T. (2019). Protegiendo al jitomate: Biocontrol al día. *Alianzas y Tendencias*, 5(7). <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/9399/3%20Protegiendo%20al%20jitomate%20Biocontrol%20al%20d%C3%ADa%20Vol%205%20No%2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hernández, A. (2011). *Desarrollo de Tomate Cherry (Solanum lycopersicum L. cv. Camelia) en Respuesta a la Biofertilización Bajo Condiciones de Casosombra y Análisis de Algunos Parámetros Fisiológicos* [tesis de maestría, Centro de Investigación en Química Aplicada]. CIQA. https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/js_pui/bitstream/1025/195/1/Armando%20Hernandez%20Perez%20C%20Maestria.pdf
- Hernández, F., Velásquez, K., Carreño, C., Gonzales, H., Estela, C., & Altamirano, C. (2015). Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de Zea mays en invernadero. *UCV Hacer*, 4(1), 10-19
- Pomar, F. (2000). *Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción de Capsicum annum L. Var annum-Verticillium dahliae Kleb* [tesis de doctorado, Universidad Da Coruña]. <https://core.ac.uk/download/pdf/61910661.pdf>
- Rai, A., Nabti, E. (2017). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Importance in Vegetable Production. Microbial Strategies for Vegetable Production*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54401-4_2
- Rojas, B. (2020). *Análisis morfológico de plantas de zarzamora Inoculadas con bacterias endófitas y hongos fitopatógenos*. Biblioteca virtual DGB. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/2083/FAPJ-M-2020-0373.pdf
- Ruiz, E., Mejía, M., Cristóbal, J., Valencia, A., & Reyes, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de Bacillus subtilis contra Colletotrichum gloeosporioides (Penz.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1325-1332. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000700015&lng=es&tlng=es.

- Ruiz, M., Ornelas, J., Olivas, I., Acosta, C., Sepúlveda, D., Zamudio, P., Berlanga, D., Salas, M., Cambero, O., & Ríos, C. (2020). Effect of *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Revista bio ciencias*, 6, e541. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33802019000100103&script=sci_arttext
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). *Prevé Agricultura 290.7 millones de toneladas de producción agrícola, pecuaria, acuícola y pesquera en 2021*. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/preve-agricultura-290-7-millones-de-toneladas-de-produccion-agricola-pecuaria-y-pesquera-en-2021>
- Torres, J., Reyes, J., Quiñones, E., & Hernandez, L. (2022). Actinomycete Potential as Biocontrol Agent of Phytopathogenic Fungi: Mechanisms, Source, and Applications. *Plants*, 11(23), 3201. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/plants11233201>
- Tozlu, E., Tekiner, N., Kotan, R., & Örtücü, S. (2018). Investigation on the biological control of *Alternaria alternata*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 88(8), 1241-1247. <https://doi.org/10.56093/ijas.v88i8.82561>
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18), 232. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n18p232>
- Mairesse, C., Giuliana, G., Duarte, S., & Concepción, L. (2018). *Efecto del producto biológico a base de bacillus subtilis sobre la antracnosis (colletotrichum fragariae brooks) y la mancha marrón (pestalotopsis sp.) en plantines de frutilla (Fragaria x ananassa Duch.)*. Bdigital. https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/12843/20-productos-naturales-bioactivos-caballero-gabriela-una.pdf
- Mondino, P., & Vero, S. (2006). *Control biológico de patógenos de plantas*. Udelar. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream>

trean/20.500.12008/20224/1/FAGRO_MondinoP_2006_ControlBiol%C3%B3gico.PDF

Muhammad, S., & Amusa, N. A. (2003). In-vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost-inhabiting microbes. *African Journal of Biotechnology*, 2(6), 161-164. <https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1033>

Zepeda, I. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*, 15, 99-108. https://www.researchgate.net/publication/324623228_Manejo_sustentable_de_plagas_agricolas_en_Mexico/fulltext/5ad97c8c458515c60f5a7635/324623228_Manejo_sustentable_de_plagas_agricolas_en_Mexico.pdf?origin=publication_detail

CAPTURA DE *Cydia pomonella* Mill. CON TRAMPAS TIPO DELTA Y ALA EN ÁRBOLES DE MEMBRILLO

Jesús García Pereyra¹, Gabriel N. Aviña Martínez¹, Rosa B. Rubio Graciano¹ y Ana María García Montelongo¹

RESUMEN

La zona frutícola de Durango sembrada con árboles de membrillo, granado, ciruelo, higo y manzano comprende 11 localidades que ocupan una superficie de 200 hectáreas, en el municipio de Nombre de Dios, Durango. De la cosecha del fruto dependen 200 familias, desde la recolección de la fruta, la cual es procesada en pequeñas microindustrias para producir vinos de mesa, cajetas y almibares. En los últimos años, en esta región se ha detectado la presencia de un insecto holometábolo que cohabita en el arbolado, principalmente de membrillo, y durante el invierno se encierra en un capullo en la corteza del mismo árbol. Inician el primer vuelo de apareamiento en el mes de marzo, ovopositan y realizan un segundo vuelo en el mes de julio. La presencia de este lepidóptero causa una pérdida económica por la reducción en la cosecha de la fruta y de los productos elaborados en la zona frutícola. En las localidades de estudio se colocaron dos tipos de trampa -tipo ala y delta- para medir la eficiencia en la captura de insectos en su etapa adulta. La colocación de trampas se realizó en dos fechas: la primera en marzo y la segunda en junio, provistas de un dispensador con una feromona Biolure® en una cantidad de 10.21 mg por trampa. Los resultados indican que la trampa tipo delta es más eficiente en un 50% en la captura de *Cydia pomonella* Mill., en ambas fechas que la trampa tipo ala con el mismo atrayente sexual.

PALABRAS CLAVE

Feromonas Biolure®, *Cydia pomonella* Mill, arboles de membrillo.

¹ Tecnológico Nacional de México, Campus Valle del Guadiana, Km 22.5 Car. México, Durango, Dgo. 34371. *jpereyra5@hotmail.com.mx

Introducción

El árbol de membrillo es originario de Asia, en la región de Cydon en Creta en la antigua Grecia, de ahí proviene su nombre científico (Segura & Torres, 2009). En esa región, su uso principal fue en la medicina por su alto contenido de mucilago que se utilizaba como laxante, pero también un símbolo de la fecundidad ofrecido a la diosa Venus.

Taxonomía y morfología

Es un árbol caducifolio que puede medir hasta 6 metros de altura, con hojas alternas, su reproducción es por semilla con alta variabilidad genética, por estaca y por acodo, Figura 1.



Familia: Rosaceae.

Especie: *Cydonia oblonga* Mill.

Porte: árbol caducifolio de 4-6 m de altura.

Hojas: alternas, de 5-10 cm de longitud, de aovadas a redondeadas.

Flores: solitarias de color blanco o rosado, miden 4-5 cm de diámetro y tienen 5 pétalos y 20 estambres.

Florece en primavera, de marzo a mayo.

Fruto: pomo piriforme, de color amarillo-dorado, muy aromático, de 7.5 cm de longitud o más, dependiendo de la variedad, con el ápice umbilicado.

Fuente: <https://antropocene.it/2019/03/03/cydonia-oblonga/>

Figura 1. Taxonomía y morfología del membrillero

Clima

Se adapta bien a climas fríos con temperaturas promedio anual de 13 °C a 27 °C, con un acumulado de 100 a 500 horas frío. Las heladas tardías pueden dañar la floración y al fruto, requiere de un promedio de 450 a 700 mm de lluvia, Figura 2.

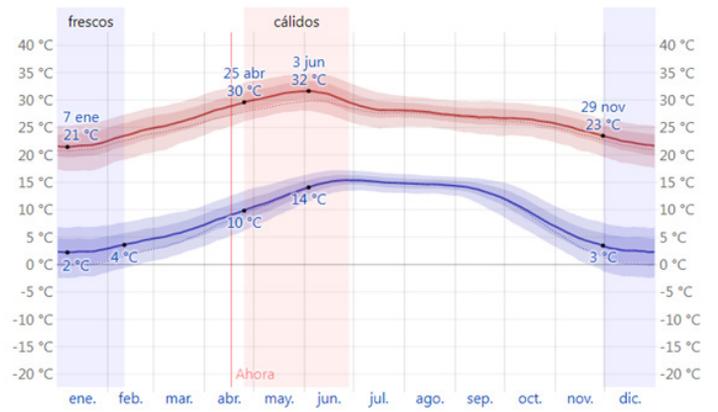


Figura 2. Temperaturas máximas y mínimas para el crecimiento y desarrollo del fruto de membrillo

Suelo

Se adapta a suelos con pH ácidos superiores a 5.0 y a básicos de 7.5, y una conductividad eléctrica menor a 1000 ppm. La textura ideal debe de contener un porcentaje de 60 de arena, 25 de limo y 15% de arcilla del tipo franco arenoso para obtener mayor drenabilidad del agua. La materia orgánica debe ser superior a 1.5% (Nuñez, 2010).

Variedades

Membrillo Gigante de Portugal tiene la característica de ramas arqueadas y de porte bajo, hojas de color verde oscuro, flores rosadas, sensible a heladas tardías, Figura 3. Membrillo Lúcuma es un árbol de crecimiento

y de hojas caducas, tamaño mediano, sabor dulce propio para usarse en repostería (Figura 4). Membrillo variedad Champion. Esta variedad se caracteriza por tener un calibre mediano, pero con mayores cualidades aromáticas y de sabor (Figura 5). Membrillo variedad Wranja. Se trata de un fruto de gran tamaño, con gran cantidad de carne, que aporta un gran rendimiento en el proceso industrial (Figura 6).



Figura 3. Fruto de membrillo variedad Gigante de Portugal



Figura 4. Fruto de membrillo variedad Lúcum



Figura 5. Membrillo variedad Champion



Figura 6. Membrillo variedad Wranja

Fuente: <https://www.sembrar100.com/arboles/membrillo/tipos-variedades/>

Plagas y Enfermedades

Diversas plagas atacan al árbol del membrillo. El pulgón *Aphis pomi* en forma de huevo inverna y se pega a las ramas. Palomilla del membrillero, *Cydia pomonella* Mill, inverna en el tronco del árbol, las hembras depositan los huevecillos en la flor y penetran al corazón del fruto (Figura 7). *Botrytis cinerea*, su presencia es por alta humedad, se reproduce por esporas y forma una mancha concéntrica, la cual se extiende pudriendo el fruto.



Figura 7. Hembra de *Cydia pomonella*

Fuente: https://www.idtools.org/id/leps/tortai/Cydia_pomonella.htm

Trampas biológicas

Monitoreo, consiste en determinar los niveles de población de insectos. Se pueden utilizar diferentes tipos de trampas elaboradas a base de cartón, vidrio o plástico a las cuales se les puede colocar un dispensador de plástico en el cual se adicionan las feromonas (Figura 8). Para determinar la presencia de palomillas se utilizan diversos compuestos a base de feromonas sexuales, la cual es una sustancia química que emite la hembra para atraer al macho para el apareamiento. Los

Tabla 1. Ingredientes activos en los dispensadores

Producto	Ingrediente Activo	Cantidad
BioLure TPW	(E)(Z)-4 Tridecen-1-il acetato	2.00 mg
BioLure PBW	GOSSYPLURE	2.80 mg
BioLure CM	(E,E)-8, 10-Dodecadien-1-ol	5.00 mg
BioLure BAW	Z-9 E-12 Tetradecen-1-ol/Z-9 E-12 Tetradecadienil	0.31 mg

Confusores sexuales

Tienen la función de liberar feromonas sintéticas en un área específica, lo cual permite confundir al macho para que no encuentre a la hembra y no logre el apareamiento, no se reproduce y no existe presencia de larvas, puede durar de 60 a 150 días el ingrediente activo. El objetivo de este trabajo fue utilizar dos tipos de trampa, Ala y Delta con atrayente sexual, colocadas en 11 huertas de la región, para monitorear la plaga y cuantificar la eficiencia en la captura por sitio y así, mediante control biológico, reducir la presencia de esta plaga en la región membrillera de Durango.

Metodología

Se realizó el monitoreo de la plaga en 11 huertas localizadas en la región membrillera en la Constanca en el municipio de Nombre de Dios Durango, se georreferencian, Tabla 2.

Tabla 2. Ubicación de las parcelas de los productores cooperantes

Nombre	Comunidad	Coordenadas
Manuel Simental Díaz	20 de Noviembre, la Constanca	23°54'28" N, 104°15'54" W
Agustín Simental Díaz	20 de Noviembre, la Constanca. Parcela la Granjita	23°54'30" N, 104°16'50" W
Agustín Simental Cruz	20 de Noviembre, la Constanca. Parcela Membrillo	23°54'30" N, 104°16'40" W
Consuelo Barros Irigoyen	El Llano, Nombre de Dios, Durango	23°50'37" N, 104°15'58" W

Captura de *Cydia pomonella* Mill. con trampas tipo delta y ala en árboles de membrillo

José Natividad Manqueros	Cardenchos, Nombre de Dios, Durango	23°53'54" N, 104°16'10" W
José Simental Díaz	Cardenchos, Nombre de Dios, Durango	23°53'44" N, 104°16'58" W
Humberto Batres	20 de Noviembre, la Constanca. Parcela los Batres	23°54'28" N, 104°15'57" W
María Nemesia Díaz	El Llano, Nombre de Dios, Durango	23°50'37" N, 104°16'58" W
Alejandro Escobedo	Nixtalpa, Nombre de Dios, Durango.	23°87'62" N, 104°25'93" W
Agustín García	El Molino, Nombre de Dios, Durango	23°54'34" N, 104°16'41" W
Francisco Lerma Luna	20 de Noviembre, la Constanca, Durango	23°54'30" N, 104°16'42" W

Se realizó la ubicación geográfica de las localidades con el objeto de localizar las parcelas para la colocación de las trampas que estuvieran cerca de la carretera y que el arbolado fuera representativo de al menos media hectárea de cobertura.

Armado y colocación de las trampas

Se colocaron seis trampas tipo Delta y seis tipo Ala bajo un diseño experimental completamente al azar para tres repeticiones, dos trampas por repetición. Para su evaluación se empleó el paquete estadístico de Olivares (1996) a una $p < 0.05$ y cuando se detectaron diferencias estadísticas significativas se procedió a la comparación de medias por DMS. En la Figura 10 se aprecia el armado de las trampas por los mismos productores.

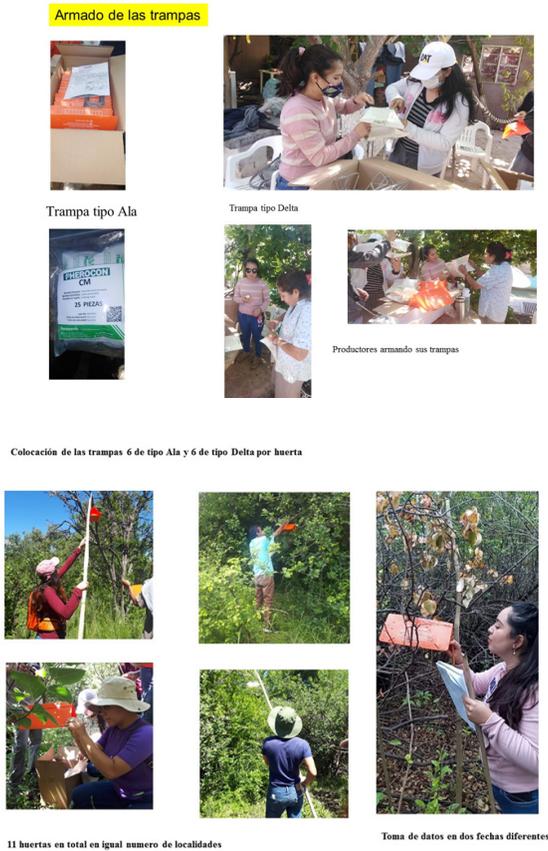


Figura 10. Armado y colocación de las trampas

En las trampas se colocó el difusor con feromonas sexuales tipo Biolure® para trabajos realizados en el mes de julio de 2021, en el segundo vuelo de la carpocapsa (Nájera, 2016). Se realizó el conteo total de palomillas capturadas por cuadrante, sumando las del primer vuelo y las del segundo, solo cambiando el difusor para que la feromona estuviera activa (Figura 11).



Figura 11. Toma de datos de la cantidad de insectos capturados por localidad y por trampa

Resultados y discusión

Los resultados del análisis de varianza indican diferencias estadísticas significativas, tanto para las localidades como para el tipo de trampa, a una $p < 0.05$ (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de Varianza para dos tipos de trampa en 11 localidades

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Localidades	10	9789.121094	978.912109	6.3343	0.000*
R(L)	22	2732.000000	124.181816		
Tratamientos	1	2164.910156	2164.910156	14.0085	0.001*
Localidades x tratamientos	10	1545.421875	154.542191	2.6060	0.029*
Error	22	1304.667969	59.303089		
Total	65	17536.121094			

La diferencia estadística muestra que la cantidad de insectos capturados en cada localidad y por tipo de trampa es diferente. Un factor que influyó para detectar estas diferencias fue que la mayor captura fue en las huertas cercanas al río en donde se tiene mayor presencia de humedad (Figura 11).

Comparación de medias

Se realizó la comparación de medias para los dos tipos de trampa (Figura 12).



Figura 12. Palomillas capturadas por localidad

Finalmente, en la Figura 12 se aprecia la cantidad total de insectos capturados por localidad, con 295 capturas para los dos vuelos. En la localidad de Nixtalpa, en el municipio de Nombre de Dios, fue la de mayor incidencia de la plaga. Probablemente lo que influye para la presencia es que esta localidad es cercana al río, en donde hay mayor humedad. Los resultados del ANOVA (Tabla 3) indican diferencias estadísticas en los tratamientos, siendo la trampa tipo Delta la de mejor respuesta en la captura en todos los sitios de monitoreo, en promedio de 80 capturas por trampa. El análisis de varianza detectó significancia estadística entre los diferentes tipos de trampa, siendo la trampa tipo Delta la que reporta mayor captura de palomillas con 80 ejemplares por huerta, contra 55 ejemplares en promedio capturadas

Captura de *Cydia pomonella* Mill. con trampas tipo delta y ala en árboles de membrillo

con trampa tipo Ala. El 90% de *Cydia pomonella* capturada fue en el estado larval L5 de la etapa adulta.

Conclusiones

El uso de la feromona de BIOLURE®, como atrayente sexual, junto con la trampa tipo Delta, es más eficiente en un 50% en la captura de *Cydia pomonella* que la trampa tipo Ala con el mismo atrayente sexual.

Agradecimientos

Al Consejo estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango por el financiamiento del proyecto.

Referencias

- Nájera, González, A. (2016). *Caracterización del ciclo biológico de Cydia pomonella (l). Mediante unidades calor en Chihuahua: región manzanera 2013-2014* [tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez]. Repositorio Institucional UACJ. <http://hdl.handle.net/20.500.11961/1738>
- Núñez-Colín, C. (2010). Distribución y caracterización eco-climática del membrillo cimarrón (*Amelanchier denticulata* (Kunth) Koch) en México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 16(3), 195-206. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2010000300008&lng=es&tlng=es.
- Olivares, Sáenz, E. (1996). *Software de diseños experimentales, versión 2.1*. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Segura M. S. & R. J. Torres. (2009). *Historia de las plantas en el mundo antiguo*. Universidad de Deusto.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE PARASITOIDES DEL GÉNERO *METEORUS* SP. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS EN MAÍZ

María Berenice González-Maldonado^{1*}, Mónica Yazmín Flores-Villegas²
y Ana Karen Serrano-Dominguez¹

RESUMEN

En el orden Hymenoptera se incluyen grupos como hormigas, avispas y abejas. Después de Ichneumonidae, Braconidae es la segunda familia más importante de avispas debido a que estos son los parasitoides más usados para el control biológico de insectos considerados plagas. En Durango, México, dentro de esta familia, taxonómicamente se reportan dos especies de *Meteorus*: *M. arizonensis* y *M. laphygmae* que cumplen con todas las características morfológicas. Sin embargo, presentan patrones de coloración distintos en el mesosoma, que no pueden considerarse para delimitar entre estas especies.

PALABRAS CLAVE

Meteorus, diversidad, maíz, Durango.

Introducción

Meteorus Haliday (Braconidae: Euphorinae: Meteorini) es un género diverso de parasitoides (endoparasitoides cenobiontes) que parasitan larvas de coleópteros y lepidópteros (Aguirre-Fernández, 2009; Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2015). Su característica más notable es el capullo que forman, el cual se cuelga por un hilo que puede medir entre 1 a 20 cm, hasta que la pupa cambia de estadio de desarrollo (Zitani *et al.*, 1997). Estos capullos pueden estar solos, algunos de ellos se pueden

¹ Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-IPN Unidad Durango. Sigma No. 119. Fracc. 20 de Nov. II. C.P. 34220. Durango, Dgo. *mbgonzalez@ipn.mx.

² Universidad Politécnica de Durango.

desarrollar en conjunto, dentro de una bolsa de seda que tejen las larvas del hospedero para protegerse de los depredadores (Stigenberg *et al.* 2011) y este es distintivo de otros géneros y especies (similar a un meteorito) construido por el último estadio larvario (Shaw, 1997).

Hasta el momento se han realizado estudios taxonómicos que han permitido conocer la diversidad de especies de este género, que alcanzan alrededor de 340 especies en todo el mundo (Ventura de Almeida & Panteado Días, 2015), de las cuales 70 son conocidas en América Central y del Sur, con especial atención a Colombia con el registro actual de 40 de estas, encontrándose nuevos hospederos para algunas de ellas. A nivel mundial Aguirre y Shaw han sido los taxónomos especialistas, quienes han reportado la mayor cantidad de especies identificadas. Al respecto, Huddleston (1986) estudió la fauna de Nueva Zelanda y reportó siete especies, Berry (1997) agregó a *M. pulchricornis* (Wesmael) a la lista, una especie exótica detectada en 1996. Todas las especies de *Meteorus* de Nueva Zelanda poseen una característica muy particular como macrópteros (alas muy desarrolladas). México ocupa el quinto lugar en América respecto al número de especies registradas, después de Estados Unidos, Costa Rica, Canadá y Brasil (Coronado-Blanco *et al.* 2018).

Los braconídeos son una familia de avispas parasíticas de insectos hemimetábolos o de crecimiento gradual, en que las ninfas son muy similares a los adultos, estas eclosionan en forma de ninfa (de color mucho más claro que la del adulto), y crecen progresivamente a través de mudas hasta llegar a la última fase (adulto). Los adultos tienen una morfología ligeramente diferente a la ninfa, sobre todo por la presencia de alas, que son las que le permiten volar y una genitalia perfectamente desarrollada. Los parasitoides holometábolos, presentan transformaciones desorganizadas, en que las larvas son considerablemente diferentes respecto a los adultos, y en los que existe una fase intermedia, pupal, entre la larva y el adulto (Bellés, 2009), estos atacan desde huevos hasta adultos de diversos órdenes de insectos: Homóptera, Hemíptera, Lepidóptera, Coleóptera, Díptera (Coronado-Blanco *et al.*, 2004).

La complejidad en la identificación de las especies de este género se debe principalmente a los caracteres morfológicos que comparten individuos de distinta especie o a las diferencias entre individuos de la misma especie (polimorfismos o patrones de color). Estos polimorfismos se presentan cuando en una población de la misma especie existen dos o más fenotipos claramente diferenciados y/o melanismos donde está la aparición de individuos de pigmentación oscura, ya sea como un polimorfismo intraespecífico o como una diferencia entre especies donde actúan varios factores como: la termorregulación, coloración críptica, aposematismo, protección contra la radiación UV, resistencia a patógenos y la selección sexual, estos factores se dan mayormente a bajas temperaturas, lo que permite a los parasitoides su alimentación, apareamiento u oviposición (Abe *et al.*, 2013).

En Durango, hasta el momento se ha realizado la identificación morfológica, genética y morfométrica de parasitoides del género *Meteorus* que tienen como hospedero al gusano cogollero. En este trabajo se presenta la parte taxonómica, por lo que el objetivo de este fue realizar un estudio más detallado para identificar las especies de braconidos parasitoides del gusano cogollero en maíz en el estado de Durango, México.

Importancia del estudio de la familia braconidae

El estudio de los braconidos en México es de gran relevancia debido a el conocimiento de su riqueza taxonómica, que incluye tanto estudios faunísticos como descripciones de nuevos taxones e investigaciones en ecología, empleando principalmente a estos organismos como indicadores de la biodiversidad. Su uso como agentes de control biológico de otros insectos, principalmente en zonas agrícolas y forestales, tienen efectos reguladores sobre las poblaciones de hospederos (Delfín-González y Burgos-Ruíz, 2000a; Coronado-Blanco *et al.* 2014).

Los braconidos son parasitoides primarios que atacan formas juveniles de otros insectos, principalmente Lepidoptera, Coleoptera y Diptera. Con algunas excepciones, las especies de la misma subfamilia parasitan hospederos de un mismo orden. Es común que parasitoides

del mismo género utilicen hospederos de la misma familia, ahí su importancia (Delfín-González y Burgos-Ruíz, 2000b).

Parasitoides de gusano cogollero

En Durango, hasta el momento se han realizado distintos trabajos que han permitido conocer la diversidad de géneros y especies que parasitan a gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae):

Braconidae subfamilia Homolobinae [(*Homolobus truncator* Say), de esta misma familia [*Chelonus insularis*, *Ch. sonorensis*, *Microchelonus cautus*, *Meteorus laphygmae* y *M. arizonensis*], también se ha estudiado la parte genética (González-Maldonado *et al.* 2019a, 2019b; 2020a; 2020b; 2021).

Ichneumonidae [(*Pristomerus spinator* Fabricius, *Campeletis sonorensis* Cameron) (García-Gutiérrez *et al.* 2013).

Trichogrammatidae [(*Trichogramma pretiosum* Riley y *Trichogramma exiguum* Pinto y Platner) y Scelionidae (*Telenomus remus* Nixon) (González-Maldonado *et al.* 2022).

Encyrtidae (*Euplectrus plathypenae* Howard) (García-Gutiérrez *et al.* 2013).

Tachinidae [(*Lespesia aletiae* Riley, *L. archippivora* Riley, *Winthemia deilephilae* Osten Sacken y *Archytas marmoratus* Townsend) (González-Maldonado *et al.* 2018).

Distribución del género *meteorus* en México

En México faltan estudios que permitan conocer la diversidad de especies del género *Meteorus*, por lo que se ha llegado al consenso de

los entomólogos que estudian esta familia que la separación de las especies se efectúe utilizando el criterio de morfoespecie (especie que no presenta una identidad o identificación morfológica). Sin embargo, hasta el momento se desconocen las especies de *Meteorus* que parasitan principalmente a gusano cogollero, debido a que es una de las principales plagas que atacan al cultivo de maíz en México, únicamente se ha reportado a: *M. laphygmae*, *M. arizonensis* y se indican otras especies como sp. o spp. (desconocidas).

Familia Braconidae

Taxonomía

Genero *Meteorus*

La familia Braconidae se distingue por tener una longitud corporal que varía de 1 a 14 mm (sin incluir las antenas y el ovipositor), la antena tiene entre 8 a 98 segmentos antenares, flagelo generalmente filiforme (en forma de hilo), pero nunca geniculado (en forma de codo), aserrado o clavado (en forma de garrote); mandíbulas bidentadas, a veces exodónticas, con tres a siete dientes; vena del ala anterior 2m-cu ausente (excepto en *Apoxyx penyai* Mason-especie conocida únicamente en Chile), vena del ala anterior 1/Rs+M presente, vena transversal 1r-m del ala posterior basal a la separación de R1 y Rs; metasoma terga 1 y 2 fusionados (Campos, 2001).

Patrones de coloración o polimorfismos de color

Se ha observado polimorfismo (variaciones fenotípicas, sin considerar su base genética) o cambio en los patrones de coloración en especies de *M. laphygmae* y *M. arizonensis* (principalmente en el mesosoma), así como variaciones muy marcadas en el tamaño de los especímenes de *M. arizonensis* (Figura 1).

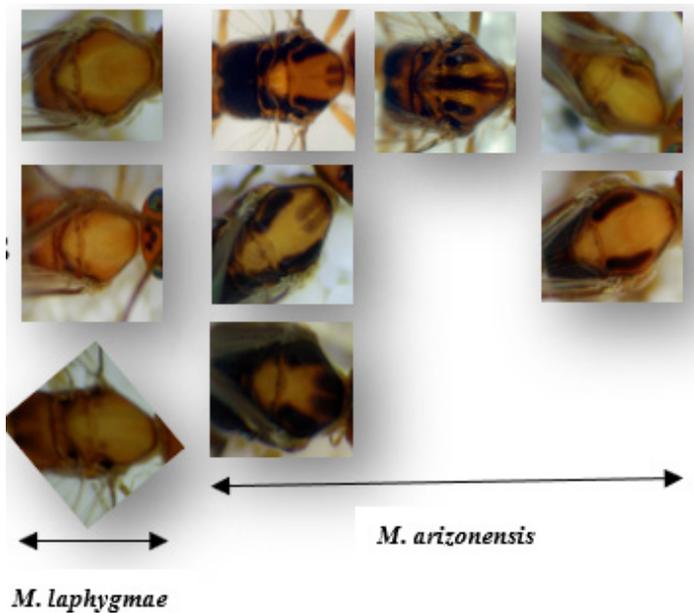


Figura 1. Polimorfismos de color presentes en el mesosoma de *M. laphygmae* y *M. arizonensis* en parasitoides en Durango, México

Ciertos tipos de polimorfismos son característicos de géneros o familias completas de animales. Algunos ejemplos son: el polimorfismo en las bandas, el polimorfismo en las manchas, el albinismo en las mariposas, los grupos sanguíneos en mamíferos y aves, las inversiones cromosómicas (cambio estructural por el cual un segmento cromosómico cambia de sentido dentro del propio cromosoma) de dípteros y los cromosomas supernumerarios en los saltamontes.

La amplia distribución de un solo tipo de polimorfismo en familias y órdenes enteros sugiere no sólo que posee un significado selectivo importante, sino que también tiene una considerable antigüedad filogenética.

Huddleston (1980) señaló como poco confiable la variación en los patrones de coloración para identificar especies de *Meteorus*, siendo que estos cambios podrían deberse a condiciones ambientales (cambios de temperatura). Como lo indican Abe *et al.* (2013) en el caso de *M.*

pulchricornis, que puede mostrar un amplio espectro de cambio de color en especies ampliamente distribuidas, como sucede con *M. arizonensis* en nuestro estudio, donde a pesar de que *M. laphygmae* muestra un color amarillo, genéticamente se encuentra en el mismo grupo que *M. arizonensis* que muestra seis patrones de coloración, por lo que podría tratarse de la misma especie (Figura 1)(González-Maldonado *et al.* 2020b).

En *Tetrix subulata* (L.), un saltamontes pigmeo que es polimórfico para el color del cuerpo (negro, rayado, marrón y blanco), siendo la misma especie, se observó que los individuos negros alcanzaron un exceso de temperatura mayor que los otros morfos de color (Forsman, 1997).

M. acerbiavorus sp. nov. presenta un color negro en casi la totalidad de su cuerpo, metasoma detrás del primer tergum: marrón rojizo oscuro, rojizo-marrón en la parte posterior y ventralmente, antenas completamente negras, palpi marrón rojizo en la base, ligeramente más pálido apicalmente, patas marrón rojizo oscuro a marrón rojizo, coxa trasera casi negra vaina del ovipositor marrón oscuro. Las alas se infunden débil y uniformemente. Pterostigma marrón, ligeramente más pálido en la base; vena costal (C+SC+R) casi negra, debido probablemente a la zona geográfica donde se desarrolla. El parasitoide tiene una distribución holártica circumpolar y es conocido en las regiones más septentrionales (Finlandia) (Stingenberg *et al.* 2016), por lo que influye la zona geográfica y el clima de la región de origen para presentar cambios de color de todo o de algunas partes del cuerpo del parasitoide.

Material colectado en Durango

El estudio se realizó en la región de los Valles, Los Llanos y las Quebradas del estado de Durango a altitudes entre 1750 y 2316 msnm, ubicados entre la latitud-longitud 24°57'46" N, 105°25'8" O y 23°57'32" N, 104°48'14" O.

Las recolectas de larvas de los primeros estadios de gusano cogollero se han realizado cada año en los ciclos primavera-verano, en

cultivos de maíz, donde no se aplicaron insecticidas químicos, las larvas recolectadas fueron individualizadas en vasos de plástico con dieta artificial (Ashby 1972) y mantenidas en una cámara de cría (25 a 27 °C, 60 % de H. R., fotoperiodo 14:10 O: L) en el CIIDIR-IPN Unidad Durango, hasta que alcanzaron su desarrollo completo o emergió el parasitoide. El material se encuentra depositado en el Museo de Insectos de la Facultad de Agronomía [MIFA], actualmente Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Identificación taxonómica

Se usaron las claves de Wharton *et al.* (1999) y la clasificación taxonómica según Yu *et al.* (2016). La identificación de especies de *Meteorus* fue corroborada a través de la comparación del material preservado con especímenes de referencia de la colección de insectos del Museo MIFA de la Universidad Autónoma de Tamaulipas y del Colegio de Posgraduados, además se utilizaron las diagnósis publicadas en Aguirre *et al.* (2011, 2015) y Muesebeck (1923). Se observaron caracteres distintos entre especímenes de la misma especie: coloración del cuerpo, patrones de coloración en el mesosoma y tamaño del cuerpo. Es posible que debido a estos cambios de coloración anteriormente se haya identificado erróneamente dentro de *M. arizonensis* o *M. laphygmae*.

Discusión

El cambio en los patrones de coloración en el mesosoma puede manifestarse en diferentes etapas del desarrollo del parasitoide, en nuestro estudio se observó preferentemente en la etapa adulta, tal como se observa en la mayoría de los especímenes de *Meteorus* presumiblemente *arizonensis*, ya que en algunos insectos se observa en estado adulto (reproductivo), como ocurre en varias especies de Odonatos. En ciertos insectos existen casos de polimorfismo en estado pupal, y en algunos tiene lugar durante la etapa larvaria, como en el lepidóptero *Precis octavia* Cramer, que presenta dos morfos controlados genéticamente (época seca y época de lluvia).

La frecuencia de algunos cambios de color puede deberse a factores ambientales. En nuestro estudio los adultos han emergido preferentemente en época de lluvias y calor ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), existen casos en los que el hombre ha influido sobre la distribución de los distintos morfotipos. Por ejemplo, los casos de polimorfismo cromático con formas oscuras o melánicas, que son más frecuentes en áreas donde la actividad industrial aumenta la densidad de los fondos de color oscuro, ciertas mariposas y palomillas presentan una mayor proporción de formas melánicas, de color oscuro, como consecuencia de la presencia de un gen dominante en áreas en las que los árboles están oscurecidos debido a la contaminación atmosférica. En el presente estudio estos cambios han ocasionado que su identificación sea confusa y en ocasiones que nos basemos en dichos patrones teniendo una identificación errónea, lo cual requiere estudios más avanzados en genética, morfometría o genitalia.

Referencias

- Abe, Y., Nishimura, T., Maeto, K. 2013. Causes of polymorphic melanism and its thermoregulatory function in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology*, 110, 627-632.
- Aguirre-Fernández, H. 2009. *Revisión taxonómica del género Meteorus Haliday, 1935 (Hymenoptera: Braconidae) en Colombia* [tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional UNC. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/70421>
- Aguirre, H., Sarmiento, C. E., Shaw, S. R. 2011. Taxonomic revision and morphometric analysis of *Meteorus* Haliday, 1835 (Hymenoptera: Braconidae: Meteorinae) from Colombia. *Zootaxa*, 2938 (1),1-68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2938.1.1>
- Aguirre, H.; Almeida, L. F. V.; Shaw, S. R.; Sarmiento, C. E. 2015. An illustrated key to neotropical species of the genus *Meteorus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Euphorinae). *ZooKeys*, 489, 33-94. <https://doi.org/10.3897/zookeys.489.9258>.

- Bélles, X. (2009). Origen y evolución de la metodología de los insectos. pp. 191-199. En Sociedad Española de Biología Evolutiva (Ed.), *Desarrollo, morfología y evolución.. Evolución y Adaptación: 150 años después del Origen de las Especies*.
- Berry, J. A. (1997). *Meteorus pulchricornis* (Wasmal) (Hymenoptera: Braconidae: Euphorinae), a new record for New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 20, 45-48.
- Campos, D. F. (2001). Lista de géneros de avispas paraitoides Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) de la Región Neotropical. *Biota Colombiana*, 2(3), 193-232.
- Coronado-Blanco, J., Zaldívar-Riverón, A. (2014). Biodiversidad de Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 372-378.
- Delfín-González, H., Burgos-Ruíz, D. (2000). Los Braconidos (Hymenoptera: Braconidae) como grupo parámetro de biodiversidad en las selvas deciduas de tropico: una discusión acerca de su uso. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 79, 43-56.
- Forsman, A. (1997). Thermal capacity of different colour morphs in the pigmy grasshopper *Tetrix subulata*. *Annales Zoologici Fennici*, 34, 145-149.
- García-Gutiérrez C., González-Maldonado M. B. & González-Hernández A. (2013). Parasitismo natural de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera) sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39, 25-29.
- González-Maldonado M. B., Hernández-Zetina D. A. & Ruíz-Cancino E. (2018). Parasitoides (Diptera: Tachinidae) del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz en Durango. Mexico. *Southwestern Entomologist*, 43, 183-187. DOI:10.3958/059.043.0110.
- González-Maldonado M. B., Correa-Ramírez M., Rosas-García N., M, Chaírez-Hernández I., Garzon-Zuñiga M. A. (2019a). Genetic variability of species of the genus *Meteorus* Haliday, 1935, at Durango, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 44, 909-918. DOI: 10.3958/059.044.0406.

- González-Maldonado, M. B., Correa-Ramírez, M. M., Mireles-Martínez, M., Chaírez-Hernández, I., Garzón-Zuñiga, M.A. (2019b). Análisis de secuencias del gen del citocromo oxidasa c región I sugiere una alta cercanía genética entre *Chelonus insularis* y *Chelonus sonorensis*. *Southwestern Entomologist*, 44, 303-306. DOI:10.3958/059.044.0132.
- González-Maldonado M. B., Coronado-Blanco, J. M. (2020a). A New record of *Homolobus* (*Apatia*) *truncator* (Say) in Durango, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 45, 319-323. DOI: 10.3958/059.045.0137.
- González-Maldonado M. B., Coronado-Blanco J. M., Lomelí-Flores J. R. (2020b). Nuevos registros de braconídeos (Hymenoptera: Braconidae) parasitoides de gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Durango, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 6, 1-4. DOI: 10.25100/socolen.v46i2.8435.
- González-Maldonado M.B., Coronado-Blanco J. M., Chaírez-Hernández, I., Correa-Ramírez, M. M. (20219). Delimitación morfológica entre *Chelonus insularis* y *Chelonus sonorensis* en la región maicera de Durango, México. *Southwestern Entomologist*, 46, 765-772. DOI:10.3958/059.046.0318.
- González-Maldonado M. B., García-González F., Ramírez-Ahujá M. L., Chaírez-Hernández I., Flores-Villegas M. Y. (2022). Microhymenoptera parasitoids of corn earworm in Maize at Durango, Mexico. *Southwestern Entomologist*, (47), 887-893. DOI:10.3958/059.047.0412.
- Gutiérrez-Ramírez, A., Robles-Bermúdez, A., Cambero-Campos, J., and Coronado-Blanco, J. M. (2015). *Meteorus arizonensis* Muesebeck, 1923 (Hymenoptera: Braconidae): new record for Mexico. *Acta Zoológica Mexicana*, (n.s.)31, 123-124.
- Huddleston, T. (1980). A revision of the western Palaearctic species of the genus *Meteorus* (Hymenoptera: Braconidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology*, 41, 1-58.
- Huddleston, T. (1986). The braconid genus *Meteorus* in Ney Zealand (Insecta: Hymenoptera). *Journal of Natural History*, 20, 255-265. Doi: 10.1080/00222938600770201.

- Muesebeck, C. F. W. (1923). A revision of the North American species of ichneumon-flies belonging to the genus *Meteorus* Haliday. *Proceedings of the United States National Museum*, 63 (2470), 1-44. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.63-2470.1>
- Shaw, S. R. (1997). Subfamily Meteorinae. In: Wharton R. A., Marsh P. M., Sharkey M. J. (Eds). Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera). *Special Publication of the International Society of Hymenopterist*, No. 1 (Washington DC), 123-136.
- Stigenberg, J., Ronquist, F. (2011). Revision of the Western Palaearctic Meteorini (Hymenoptera: Braconidae), with a molecular characterization of hidden fennoscandian species diversity. *Zootaxa*, 3084, 1–95.
- De Almeida, L. F., & Dias, A. M. (2015). Five new species of *Meteorus* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Euphorinae) from Brazil. *Zootaxa*, 4057(2), 231–247. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4057.2.4>
- Wharton, A. R., Marsh, P. M., Sharkey, M. J. (1998). *Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)*. International Society of Hymenopterists
- Worden, A. N. (ed.). (1947). *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals; with an appendix on statistical analysis*. Bailliere, Tindall & Cox.
- Zitani, N. M., Shaw, S. R., Janzen, D. H. (1997). Description and biology of a new species of *Meteorus* Haliday (Hymenoptera: Braconidae, Meteorinae) from Costa Rica, parasitizing larvae of *Papilio* and *Parides* (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 6, 178-185.
- Yu, D. S., Achterberg, C. V. & Horstmann, K. (2016). *Taxapad 2016, Ichneumonoidea 2016, Database on flash-drive*. Ottawa, Ontario, Canada.

EFFECTO DE ELICITORES EN RESPUESTA A INFECCIÓN POR *Fusarium* SP. EN AGUACATE

Alexa Paola Plaza Ávila¹, Joaquín Alejandro Qui Zapata¹ y
Antonia Gutiérrez Mora^{1*}

RESUMEN

Fusarium euwallaceae es un hongo fitopatógeno asociado con escarabajos barrenadores del género *Euwallacea*. En el 2012 surgieron los primeros reportes de daños causados por este complejo ambrosial en cultivos de aguacate en Estados Unidos e Israel, derivando en importantes pérdidas económicas. Durante el año 2015 fue detectada la presencia de *Euwallacea* sp. en territorio nacional. Debido a la amenaza que representa para diversas plantas de importancia económica, ornamental y forestal, incluyendo el aguacate, es crucial el desarrollo de estrategias para contener su propagación, así como el control de la infección.

Los inductores de defensa vegetal, también conocidos como “elicitores”, son sustancias que desencadenan una respuesta de defensa en las plantas, lo que eventualmente puede derivar en una mayor resistencia a enfermedades.

Con el fin de evaluar la inducción de la respuesta de defensa en plantas de aguacate, se aplicaron dos elicitores: ácido salicílico y jasmonato de metilo en dos dosis en plantas bajo condiciones experimentales de invernadero, las cuales posteriormente fueron inoculadas con un aislado de *Fusarium* sp. de un complejo ambrosial. Se cuantificó la actividad de peroxidasas y β 1,3-glucanasas, así como acumulación de compuestos fenólicos totales.

Se presentó un efecto diferencial en la actividad enzimática y acumulación de compuestos fenólicos totales asociada a la aplicación de estos elicitores, su dosis y el inóculo de *Fusarium* sp., tanto a nivel local (tallo) como sistémico (hojas). Esto sugiere que la utilización

¹ CIATEJ Subsede Zapopan, Unidad de Biotecnología Vegetal, Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, México 45019. *agutierrez@ciatej.mx

de estos compuestos podría representar una alternativa para inducir una respuesta de defensa en las plantas, aumentando su resistencia ante enfermedades.

PALABRAS CLAVE

Persea americana, *Fusarium*, elicitors, inductores de defensa.

Introducción

El aguacate (*Persea americana*), perteneciente a la familia de las lauráceas, goza de gran importancia económica y cultural a nivel mundial debido a su fruto, siendo México líder en su producción y exportación (SADER, 2023). Existen antecedentes de daños en aguacate causados por *Fusarium euwallaceae*, un hongo fitopatógeno dispersado por el coleóptero barrenador *Euwallacea fornicatus*, en países como Estados Unidos (Eskalen *et al.*, 2013) e Israel (Mendel *et al.*, 2012), y se considera causante de la marchitez o muerte regresiva de *Fusarium*. Los síntomas pueden incluir presencia de exudados, marchitez o incluso derivar en la muerte del árbol hospedero, al verse afectado el xilema (Freeman *et al.*, 2013). Actualmente en México es considerada una plaga cuarentenaria: presente, pero con distribución restringida a algunas zonas de Baja California (SENASICA, 2019).

La dispersión de *Fusarium euwallaceae* representa un riesgo para diversas especies de importancia económica, cultural y ornamental en México, destacando el cultivo de aguacate. Debido a esto, resulta necesario evaluar y poner en práctica estrategias para contener su propagación y para el control de la infección, considerando que estas no involucren la manipulación directa del hongo debido a cuestiones de bioseguridad.

Con el fin de evaluar el modelo de inducción de resistencia derivada de la aplicación de elicitors, se utilizaron plantas de aguacate en condiciones de invernadero en una interacción con un hongo asociado con un complejo ambrosial.

Metodología

Se seleccionaron plantas de *Persea americana* en condiciones de invernadero con al menos 1 cm de grosor del tallo a una altura de 10 cm de la base, sin síntomas de enfermedades. Para la inducción del sistema de defensa con los elicitores se realizó una aplicación foliar con un atomizador de 10 ml de elicitor por planta. Se evaluó a elicitores: ácido salicílico (SA) y jasmonato de metilo (MeJa), con dos dosis de cada uno [1] 50 μM y [2] 500 μM . Como control se utilizaron plantas tratadas con agua destilada estéril. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de tratamientos en *Persea americana*

Tratamiento	Descripción
C	Control, plantas tratadas con agua destilada estéril
Fu	Plantas inoculadas con <i>Fusarium</i> sp.
SA[1]	Plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM
SA[2]	Plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM
MeJa[1]	Plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μM
MeJa[2]	Plantas tratadas con jasmonato de metilo 500 μM
SA[1]+Fu	Plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM e inóculo de <i>Fusarium</i> sp.
SA[2]+Fu	Plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM e inóculo de <i>Fusarium</i> sp.
MeJa[1]+Fu	Plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μM e inóculo de <i>Fusarium</i> sp.
MeJa[2]+Fu	Plantas tratadas con jasmonato de metilo 500 μM e inóculo de <i>Fusarium</i> sp.

Después de 21 días de la aplicación de los elicitores, se realizó una perforación en el tallo y se inocularon 200 μl de una suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) de *Fusarium* sp. aislado de un complejo ambrosial o de agua destilada estéril, posteriormente se cubrieron con plástico adherente. Se realizaron muestreos de hojas y del segmento del tallo donde se realizó la perforación para la inoculación (D0) y los días 1, 5 y 15 después de la inoculación.

Para la determinación de las actividades enzimáticas, las muestras se maceraron en nitrógeno líquido y fueron resuspendidas en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7. Para la cuantificación de compuestos fenó-

licos totales, las muestras se colocaron en metanol al 80% (v/v), se centrifugaron a 4700 rpm a 4°C durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Determinación de actividad de peroxidasas

Se tomó como referencia el protocolo de Oliveira *et al.* (2014). El resultado se expresó como unidad de peroxidasa por gramo de proteína total (UA•g⁻¹ PT).

Determinación de actividad de β-1,3 glucanasas

Se realizó con base en el protocolo de Oliveira *et al.* (2014). Se tomó la glucosa como estándar. El resultado se expresó como nkat por gramo de proteína total (nkat•g⁻¹•g⁻¹ PT).

Acumulación de compuestos fenólicos totales

Se basó en el protocolo de Ainsworth y Gillespie (2007) con modificaciones. Un extracto metanólico fue cuantificado con reactivo de Folin Cicalteau a 650 y 725 nm con una curva de catecol. El resultado se expresó como nM catecol•mg⁻¹ FW (peso fresco).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey (P<0.05).

Resultados y discusión

Se utilizaron como inductores de la defensa de plantas de aguacate el ácido salicílico (SA) y el jasmonato de metilo (MeJa) con el fin de abarcar las dos principales rutas de señalización involucradas en la inmunidad de las plantas. Se ha descrito que los niveles de ácido

salicílico aumentan tras una infección por un patógeno biotrófico (Lefevere *et al.*, 2020), mientras que la activación de la vía del ácido jasmónico se asocia con el daño mecánico causado por insectos masticadores, herbívoros y patógenos necrotróficos (Schweiger *et al.*, 2014). Se evaluó la inducción de una respuesta bioquímica a través de la cuantificación de las actividades enzimáticas de proteínas asociadas a la patogénesis (PR) como peroxidasas y β -1,3 glucanasas, así como acumulación de compuestos fenólicos totales a nivel local (tallo, sitio donde se realizó el barrenado e inóculo) y sistémico (hojas).

La inducción y acumulación de proteínas PR ocurre en las plantas después de ser sometidas a condiciones de estrés. Esto no se limita al sitio expuesto directamente a la fuente de estrés, sino que también puede producirse en tejidos remotos (Jain & Khurana, 2018). Entre las proteínas PR se encuentran las peroxidasas, las cuales se asocian con el control de daños inducidos por estrés oxidativo, así como con la polimerización de compuestos fenólicos a sustancias similares a la lignina, que al depositarse en la pared celular de las plantas puede llegar a interferir con el proceso de infección por patógenos (Agris, 2005).

En la actividad de peroxidasas se observó una diferencia estadística en muestreos, tratamientos y dosis a nivel local como sistémico ($p < 0.05$) (Tabla 2). A nivel local las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (Fu) no presentaron diferencias significativas. El tratamiento con ácido salicílico con la concentración 50 μ M (SA[1]) presentó un aumento significativo el día 15 (D15). Destaca que los tratamientos con las dosis más altas de ambos elicitores (SA[2] y MeJa [2]) presentaron una disminución significativa de actividad el día del barrenado (D0), aumenta posteriormente al nivel del testigo en las plantas que solamente recibieron el elicitore. Al recibir el inóculo (SA [2]+ Fu y MeJa[2]+ Fu) se produjo un aumento significativo tras 24 horas (D1), lo cual se mantuvo hasta el día 5 (D5).

A nivel sistémico, las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (Fu) exhibieron un aumento significativo de actividad hasta el día 15 (D15). Los tratamientos que solamente recibieron elicitores, pero no inóculo, presentaron cambios significativos después del barrenado.

En los tratamientos con elicitores e inóculo, solamente el ácido salicílico en la menor dosis (SA [1]+ Fu) exhibió un aumento significativo durante el día 5 (D5).

Se observó una inducción de respuesta local y sistémica principalmente con el ácido salicílico. La respuesta con jasmonato de metilo se observó principalmente a nivel local. La inoculación con *Fusarium* sp. no representó una diferencia significativa.

Tabla 2. Actividad de peroxidasas en hojas y tallos de *Persea americana*. El color representa un aumento (verde) o disminución (rojo) con respecto al control. Medias con letras diferentes al mismo tiempo difieren por prueba LSD para $p < 0.05$

Días	Tratamiento	Hojas	Tallos
		UA / g proteína total	UA / g proteína total
D0	C	0.217 ± 0.375 bc	0.317 ± 0.327 c
	SA[1]	0.086 ± 0.066 ab	0.212 ± 0.121 abc
	SA[2]	0.138 ± 0.210 abc	0.088 ± 0.053 ab
	MeJa[1]	0.007 ± 0.004 a	0.233 ± 0.192 bc
	MeJa[2]	0.31 ± 0.329 c	0.069 ± 0.024 a
D1	C	0.017 ± 0.024 a	0.046 ± 0.032 ab
	Fu	0.238 ± 0.378 ab	0.016 ± 0.01 a
	SA[1]	0.567 ± 0.832 bc	0.045 ± 0.028 ab
	SA[2]	0.725 ± 0.746 c	0.028 ± 0.019 ab
	MeJa[1]	0.61 ± 0.627 c	0.057 ± 0.028 b
	MeJa[2]	0.072 ± 0.061 a	0.036 ± 0.026 ab
	SA[1]+ Fu	0.03 ± 0.025 a	0.026 ± 0.01 ab
	SA[2]+ Fu	0.032 ± 0.035 a	0.205 ± 0.074 d
	MeJa[1]+ Fu	0.034 ± 0.032 a	0.036 ± 0.038 ab
MeJa[2]+ Fu	0.184 ± 0.275 a	0.138 ± 0.108 c	
D5	C	0.099 ± 0.11 a	0.06 ± 0.062 ab
	Fu	0.265 ± 0.482 ab	0.029 ± 0.027 a
	SA[1]	0.075 ± 0.054 a	0.041 ± 0.04 ab
	SA[2]	0.123 ± 0.202 a	0.214 ± 0.356 bcd
	MeJa[1]	0.352 ± 0.711 ab	0.07 ± 0.037 abc
	MeJa[2]	0.77 ± 0.969 b	0.076 ± 0.097 abc
	SA[1]+ Fu	0.8 ± 1.403 b	0.08 ± 0.076 abc
	SA[2]+ Fu	0.574 ± 0.399 ab	0.342 ± 0.547 d
	MeJa[1]+ Fu	0.383 ± 0.459 ab	0.128 ± 0.117 abc
MeJa[2]+ Fu	0.613 ± 0.71 ab	0.24 ± 0.218 cd	

D15	C	0.355 ± 0.268 a	0.366 ± 0.228 a
	Fu	1.182 ± 0.325 bc	0.333 ± 0.163 a
	SA[1]	1.619 ± 0.904 c	1.051 ± 0.64 b
	SA[2]	0.663 ± 1.056 ab	0.047 ± 0.02 a
	MeJa[1]	0.474 ± 0.295 a	0.042 ± 0.02 a
	MeJa[2]	0.349 ± 0.449 a	0.015 ± 0.006 a
	SA[1]+ Fu	0.297 ± 0.366 a	0.009 ± 0.003 a
	SA[2]+ Fu	0.67 ± 0.994 ab	0.076 ± 0.05 a
	MeJa[1]+ Fu	0.421 ± 0.815 a	0.096 ± 0.061 a
	MeJa[2]+ Fu	0.529 ± 0.572 a	0.178 ± 0.131 a

Las β -1,3 glucanasas están involucradas directamente en la degradación de la pared celular de hongos potencialmente patógenos, lo cual puede liberar β -1,3 glucanos induciendo respuestas locales y sistémicas en la planta (Balasubramanian *et al.*, 2012). A nivel local (Tabla 3), las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (Fu) no presentaron diferencias significativas. Se presentaron cambios significativos en los tratamientos con elicitores, destacando el día 15 (D15), ya que en la mayoría de los tratamientos (independientemente del inóculo) se presentó una disminución significativa.

A nivel sistémico (Tabla 3) se observó que en las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (Fu) se presentó un aumento significativo hasta el día 15 (D15). Ambas dosis de ácido salicílico (SA[1] y SA[2]) presentaron una disminución significativa el día del barrenado (D0), aumentando a nivel del testigo el día uno (D1) y volviendo a aumentar significativamente el día 15 (D15) en SA[1]. También se presentaron cambios significativos en los tratamientos con jasmonato de metilo sin inóculo (MeJa[1] y MeJa[2]). En los tratamientos que incluían el inóculo, solamente se presentaron diferencias significativas en SA[1]+Fu y MeJa[2]+Fu.

Se observó una inducción de respuesta local y sistémica principalmente con el ácido salicílico. La respuesta con jasmonato de metilo se observó principalmente a nivel local. La inoculación de *Fusarium* sp. no representó una diferencia significativa.

Efecto de elicitores en respuesta a infección por *Fusarium* sp. en aguacate

Tabla 3. Actividad de β -1,3 glucanasas en hojas y tallos de *Persea americana*. El color representa un aumento (verde) o disminución (rojo) con respecto al control. Medias con letras diferentes al mismo tiempo difieren por prueba LSD para $p < 0.05$

Días	Tratamiento	Hojas	Tallos
		nKat / g proteína total	nKat / g proteína total
D0	C	4.325 ± 1.052 c	3.096 ± 2.157 bc
	SA[1]	2.152 ± 0.588 ab	1.307 ± 0.388 a
	SA[2]	2.022 ± 0.618 a	4.402 ± 2.78 c
	MeJa[1]	4.266 ± 3.920 c	4.429 ± 2.816 c
	MeJa[2]	4.014 ± 3.01 bc	2.03 ± 0.79 ab
	D1	C	6.52 ± 3.675 abcd
Fu		4.85 ± 1.88 ab	1.906 ± 0.395 a
SA[1]		8.608 ± 6.799 de	1.367 ± 0.331 a
SA[2]		8.461 ± 2.752 de	7.29 ± 3.8 e
MeJa[1]		4.035 ± 2.234 a	2.487 ± 1.091 ab
MeJa[2]		12.498 ± 1.399 f	4.43 ± 2.377 cd
SA[1]+ Fu		10.575 ± 3.024 ef	2.899 ± 0.835 abc
SA[2]+ Fu		8.216 ± 5.479 cde	3.78 ± 1.71 bcd
MeJa[1]+ Fu		5.371 ± 2.450 abc	1.818 ± 0.634 a
MeJa[2]+ Fu		7.681 ± 2.818 bcde	4.531 ± 3.237 d
D5	C	7.301 ± 3.154 bc	2.697 ± 0.727 ab
	Fu	9.542 ± 1.481 c	1.791 ± 1.127 a
	SA[1]	5.433 ± 2.254 ab	3.655 ± 1.741 bcd
	SA[2]	6.022 ± 3.572 b	2.331 ± 1.268 a
	MeJa[1]	6.303 ± 4.422 b	4.439 ± 3.05 d
	MeJa[2]	5.523 ± 4.508 ab	2.975 ± 0.571 abc
	SA[1]+ Fu	4.978 ± 1.460 ab	2.7 ± 0.822 ab
	SA[2]+ Fu	4.985 ± 1.553 ab	4.384 ± 2.132 d
	MeJa[1]+ Fu	6.102 ± 4.807 b	4.099 ± 1.806 cd
	MeJa[2]+ Fu	3.251 ± 1.22 a	2.285 ± 1.213 a
D15	C	4.984 ± 2.667 b	3.724 ± 0.787 b
	Fu	8.153 ± 1.896 c	3.354 ± 0.567 b
	SA[1]	10.179 ± 6.357 c	3.11 ± 1.326 b
	SA[2]	2.799 ± 0.980 a	1.676 ± 0.817 a
	MeJa[1]	2.424 ± 0.317 a	1.087 ± 0.275 a
	MeJa[2]	5.085 ± 2.353 b	1.873 ± 1.134 a
	SA[1]+ Fu	4.249 ± 1.108 ab	1.169 ± 0.162 a

SA[2]+ Fu	3.365 ± 1.594 ab	1.619 ± 0.426 a
MeJa[1]+ Fu	4.403 ± 1.042 ab	3.445 ± 1.963 b
MeJa[2]+ Fu	3.46 ± 1.165 ab	1.726 ± 0.767 a

Los compuestos fenólicos pueden ser tóxicos para los patógenos, y generalmente se producen y acumulan tras la infección (Agrios, 2005). A nivel local (Tabla 4) se observó que las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (Fu) presentaron un aumento significativo hasta el día 15 (D15). Existieron diferencias significativas en todos los tratamientos con elicitores.

A nivel sistémico (Tabla 4), las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (Fu) presentaron cambios significativos: un aumento en el día 1 (D1), disminución en el día 5 (D5) y nuevamente un aumento en el día 15 (D15). Las plantas tratadas con ácido salicílico (SA) solamente llegaron a presentar diferencias significativas al no ser inoculadas.

En las plantas tratadas con jasmonato de metilo (MeJa) que no recibieron inóculo, solamente se observó una disminución significativa el día de la aplicación del agua estéril (D0), a partir del día 1(D1) los niveles son iguales a los del testigo. En las plantas inoculadas se presentó una disminución significativa el día 1 (MeJa[1]+Fu) y 5 (MeJa[2]+Fu).

Se observó una inducción de respuesta local y sistémica con ambos elicitores y una inducción de respuesta adicional con la inoculación con *Fusarium* sp.

Tabla 4. Acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas y tallos de *Persea americana*.

El color representa un aumento (verde) o disminución (rojo) con respecto al control.

Medias con letras diferentes al mismo tiempo difieren por prueba LSD para $p < 0.05$

Días	Tratamiento	Hojas	Tallos
		nm catecol /mg peso fresco	nm catecol / mg peso fresco
D0	C	9.774 ± 0.774 b	7.909 ± 2.102 a
	SA[1]	9.208 ± 1.657 b	12.244 ± 5.709 b
	SA[2]	9.256 ± 1.238 b	7.445 ± 2.472 a
	MeJa[1]	7.979 ± 1.538 a	6.801 ± 0.782 a
	MeJa[2]	7.279 ± 0.744 a	7.074 ± 2.366 a
D1	C	8.097 ± 2.127 bc	8.496 ± 1.335 d

Efecto de elicitores en respuesta a infección por *Fusarium* sp. en aguacate

	Fu	10.469 ± 2.226 de	7.57 ± 1.811 cd
	SA[1]	9.17 ± 1.431 cd	6.675 ± 0.886 bc
	SA[2]	10.924 ± 0.657 e	7.087 ± 0.671 c
	MeJa[1]	6.543 ± 1.104 ab	7.383 ± 1.291 cd
	MeJa[2]	8.852 ± 2.944 cd	8.353 ± 1.042 d
	SA[1]+ Fu	7.787 ± 1.927 bc	6.96 ± 1.482 bc
	SA[2]+ Fu	6.792 ± 2.5 ab	7.255 ± 0.786 cd
	MeJa[1]+ Fu	5.427 ± 0.784 a	5.812 ± 1.477 ab
	MeJa[2]+ Fu	6.652 ± 3.309 ab	5.27 ± 3.186 a
D5	C	7.042 ± 1.766 c	5.6 ± 0.506 b
	Fu	5.995 ± 1.191 ab	5.54 ± 0.8 b
	SA[1]	6.248 ± 1.216 bc	5.688 ± 1.15 b
	SA[2]	6.440 ± 0.432 bc	6.726 ± 0.476 d
	MeJa[1]	6.402 ± 0.480 bc	6.403 ± 0.281 cd
	MeJa[2]	6.483 ± 2.944 bc	6.281 ± 0.52 cd
	SA[1]+ Fu	6.589 ± 0.793 bc	6.857 ± 0.564 d
	SA[2]+ Fu	6.260 ± 0.309 bc	6.509 ± 0.260 cd
	MeJa[1]+ Fu	6.489 ± 0.532 bc	5.948 ± 0.613 bc
	MeJa[2]+ Fu	5.505 ± 1.055 a	4.837 ± 1.378 a
D15	C	3.998 ± 2.434 a	4.602 ± 0.894 cd
	Fu	7.805 ± 3.302 d	5.943 ± 1.324 e
	SA[1]	5.827 ± 0.637 c	5.673 ± 0.543 e
	SA[2]	5.702 ± 0.496 bc	5.375 ± 0.667 de
	MeJa[1]	4.373 ± 0.719 a	3.541 ± 0.62 ab
	MeJa[2]	4.14 ± 0.293 a	3.256 ± 0.376 a
	SA[1]+ Fu	4.993 ± 0.607 abc	4.197 ± 0.609 bc
	SA[2]+ Fu	4.2 ± 0.760 a	3.641 ± 0.424 ab
	MeJa[1]+ Fu	5.057 ± 0.928 abc	5.826 ± 2.715 e
	MeJa[2]+ Fu	4.587 ± 0.469 ab	3.884 ± 0.504 abc

La aplicación de los elicitores permitió observar una respuesta diferenciada en la planta, elicitor y dosis dependiente. Sin embargo, no en todas las determinaciones fue posible obtener una respuesta diferenciada en la inoculación con *Fusarium* sp. Aunque este aislado proviene de un complejo ambrosial, no parece tener los mecanismos de patogénesis específicos de *F. enwallaceae*. Sin embargo, la metodo-

logía desarrollada podría ser usada en condiciones de confinamiento propias del nivel de contención de *F. euwallaceae*.

Conclusiones

El barrenado, aplicación de elicitores e inóculo con *Fusarium* sp. presentó un efecto diferencial en la actividad enzimática (peroxidasas y β -1,3 glucanasas) y acumulación de compuestos fenólicos totales en plantas de aguacate. Esto podría asociarse con la inducción de una respuesta de defensa y potencial resistencia. El uso de elicitores podría representar una alternativa para la inducción y estudio de los mecanismos de defensa en plantas.

Agradecimientos

Se agradece al CONAHACYT a través del proyecto FORDECyT 292399 y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo otorgado para realizar la presente investigación.

Referencias

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. (5^a ed). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50012-9>
- Ainsworth, E. A. & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N. (2012). Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, 34(11), 1983–1990. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch S. C., Rugman-Jones, P. F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A. & Thibault, T. (2013). Host range of *Fusarium* dieback and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolyti-

- nae) vector in southern California. *Plant Disease*, 97(7), 938-951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1026-RE>
- Freeman, S., Sharon, M., Maymon, M., Mendel, Z., Protasov, A., Aoki, T., Eskalen, A., & O' Donnell, K. (2013). *Fusarium* euwallaceae sp. nov.—a symbiotic fungus of Euwallacea sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. *Mycologia*, 105(6), 1595-1606. <https://doi.org/10.3852/13-066>
- Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. En A. Singh y I. K. Singh (eds.), *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 265-281). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, artículo 338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Mendel, Z., Protasov, A., Sharon, M., Zveibil, A., Yehuda, S. B., O' Donnell, K., Rabaglia, R., Wysoki, M., & Freeman, S. (2012). An Asian ambrosian beetle *Euwallacea fornicatus* and its novel symbiotic fungus *Fusarium* sp. pose a serious threat to the Israeli avocado industry. *Phytoparasitica*, 40(3), 235-238. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0223-7>
- Oliveira, J. T. A., Barreto, A. L. H., Vasconcelos, I. M., Eloy, Y. R. G., Gondin, D. M. F., Fernandes, C. F., & Freire-Filho, F. R. (2014). Role of antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and PR proteins in the compatible and incompatible interactions of Cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2(3), artículo 1000131. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-955X.1000131>
- Schweiger, R., Heise, A. M., Persicke, M., & Müller, C. (2014). Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. *Plant, Cell and Environment*, 37(7), 1574-1585. <https://doi.org/10.1111/pce.12257>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (11 de febrero de 2023). *Refrenda México liderazgo internacional en producción sustentable y ex-*

portación de aguacate. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/refrenda-mexico-liderazgo-internacional-en-produccion-sostenible-y-exportacion-de-aguacate?idiom=es>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. (2019). *Complejo Escarabajo barrenador polífago (Euvallacea sp. – Fusarium euvallaceae): Ficha Técnica No.62*. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20del%20escarabajo%20barrenador%20pol%C3%ADfago.pdf>

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE *Botrytis cinerea* EN FRUTOS DE MEMBRILLO

Jesús García Pereyra^{1*}, Sergio de los Santos Villalobos², Jesús García Montelongo¹, Sebastián E. González Villarreal³ y Mónica García Montelongo³

RESUMEN

Botrytis cinerea es un hongo necrotrófico de la pudrición gris en frutos de membrillo, aparece en la fruta en forma de mancha circular la cual se extiende a todo el fruto y lo pudre. La penetración del hongo en la planta se produce en primavera formando conidios que se dispersan con el viento y el agua, penetrando a través de las estomas o heridas provocadas por las plagas de forma natural, a nivel celular invade el tejido con los conidios y causa necrosis en el tejido blando. Para este propósito se recolectó fruta de membrillo, hojas y tallo con los síntomas evidentes de la presencia del hongo en 11 localidades, en la región de la Constanza, Nombre de Dios, Durango. Se determinó la morfología del hongo mediante técnicas microbiológicas empleando como medio de cultivo Agar Dextrosa Papa al cual se le adicionó 2% de estreptomycinina y 2% de ácido láctico para inhibir el crecimiento bacteriano en suelo y fruta, se incubó a 24 °C por 5 días, se evaluó el crecimiento del halo en mm, la forma de la colonia, el color del micelio y la cantidad de esporas por mililitro. Se realizó el análisis de varianza a una $p < 0.05$ para la medición de esporas en un diseño experimental completamente al azar y la comparación de medias por DMS, para 11 Localidades con tres repeticiones. Se detectó significancia estadística en crecimiento del hongo por huerta, con una fluctuación de 8 a 15 mm de diámetro. Para los esclerocios; de 1.3 a 1.8 mm de tamaño, la

¹ Tecnológico Nacional de México, Campus Valle del Guadiana, Km 22.5 Car. Durango-México. 34371. * jpereyra5@hotmail.com.mx

² Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur, 85000, Cd. Obregón, Sonora, México.

³ Instituto de Salud Pública de Durango-34217, México.

forma de las colonias fue el 60% redonda y el restante irregular, el color del micelio de gris claro a gris oscuro. En los conidios el 70% fue elíptica variación en tamaño de 5.5 a 9.5 μm .

PALABRAS CLAVE

Botrytis cinerea, membrillo, microbiología.

Introducción

El árbol de membrillo tiene su origen en la región del Cáucaso en Asia, fue introducido en México por los frailes españoles (Segura y Torres, 2009). La fruta tiene diversos usos, pero especialmente para la elaboración de licores, ates, mermeladas y como consumo en fresco. La zona cercana a las semillas es muy rica en mucílago, la cual tiene diferentes usos en farmacia y perfumería (Carrera y Mateo, 2005). Tiene una importancia económica ya que en México la producción de membrillo supera las 5 100 toneladas Durango, Jalisco, y Zacatecas como líderes productores, en conjunto concentran el 77 % del total nacional (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

El árbol alcanza una altura de 6 m, corteza lisa, copa irregular, flores de color blanco o rosado, cinco pétalos y 20 estambres, florece de marzo a mayo, hojas caducifolias, los frutos se forman en la extremidad de los pequeños brotes, sobre brindillas o en ramos del año anterior (Muñoz, 2005). *Botrytis cinerea*, llamado moho gris, es un hongo con abundante micelio gris, conidióforos largos y ramificados en forma de racimo de uvas (Buitrón, 2012). La infección se produce cuando el conidio diseminado entra en contacto con el hospedero; también ocurre cuando una superficie infestada con micelio entra en contacto con tejido sano. *B. cinerea*, aislado del cultivo de fresa, presenta conidióforos septados, grandes y gruesos (más o menos 10 μm de diámetro), café oscuro, ramificados en la parte distal, con ápices hinchados y pequeños esterigmas productores de conidios lisos, unicelulares, café claro, de elipsoides a ovoides de 10.8-19.6 x 5.9-9.8 μm , en promedio 13.0-7.4 μm (Agrios, 2004). La temperatura

es muy importante para la germinación de conidios de *B. cinerea* en un rango de 0 a 22 OC, 65% de humedad relativa, Tabla 1.

Tabla 1. Temperaturas óptimas durante el ciclo biológico de *Botrytis cinerea*

Fase de desarrollo	Temperatura Óptima (OC)
Crecimiento de micelio	22
Esporulación	15
Germinación de las esporas	20
Crecimiento del tubo de germinación	30
Formación del apresorio	15-28
Formación de esclerocios	11-13
Germinación de esclerocios	22-24

Fuente: Rioja *et al.*, 2000.

El ciclo de vida de *B. cinerea* es de 90 días, pero las esporas pueden durar hasta 14 meses Figura 1.

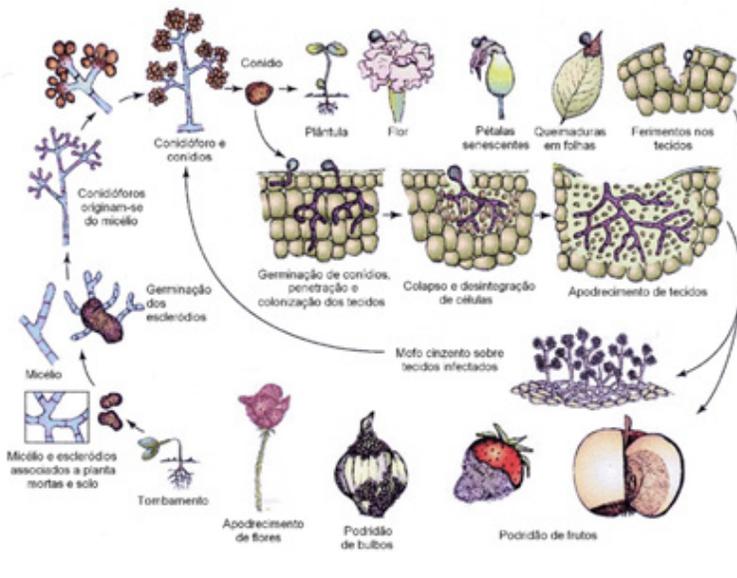


Figura 1. Ciclo de vida del hongo *Botrytis cinerea*

Fuente: researchgates.net

Metodología

Se realiza el monitoreo y toma de muestra de frutos en suelo y follaje en la zona membrillera situada en el paralelo 23o54'28" N, 104o15'54" W en el mes de septiembre del año 2020 (Figura 2).



Ubicación de la región

Figura 2. Ubicación de la región membrillera, municipio de Nombre de Dios, Durango

Para la colecta del material en suelo se prepararon trampas. Para la captura y aislamiento del hongo se prepararon 10 vasos de unícel con arroz precocido, húmedo en papel filtro (Figura 3).



Recipiente
contenedor



Arroz
precocido



Humedecido



Empacado con
papel filtro o gasa



Ensamblado



Adición de
estreptomicina
2 gramos por
trampa



Ácido láctico 2%



Colocación y
ubicación de los sitios



Aislamiento

Figura 3. Método de elaboración de trampas para hongos en el suelo

La colocación fue de 3 metros, aproximadamente, de una trampa a otra, en donde se dejaron por 22 días humedeciendo con agua destilada cada siete días. Para la siembra en agar dextrosa papa se usaron 14 gramos de PDA por litro y se colocaron 20 mililitros de agar por caja. Para la siembra se extrajeron 5 gramos del material

infectado de cada membrillo. De cada huerta, siete membrillos en total, se realizó un compuesto balanceado para las huertas, una por cada localidad, se realizaron diluciones seriadas 1:10, 100 y 1000 de las muestras de fruto de membrillo y se sembraron en cajas Petri, en un medio selectivo a base de PDA, (se adicionó 2% ácido láctico con dos gramos por litro), se dejó incubar en una estufa NOVATECH® por siete días a una temperatura de 24 0C. El conteo de esporas por mililitro se efectuó en una cámara de Neubauer. Los resultados se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. En cuanto al crecimiento de esporas, se realizó el ANOVA y cuando se detectaron diferencias estadísticas significativas se realizó la comparación de medias por DMS a una $p < 0.05$ (Oliveras, 1996). Se evaluó el crecimiento del halo en mm, la forma de la colonia, el color del micelio. Adicionalmente se analizó la fertilidad del suelo por huerta para detectar deficiencias nutrimentales bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT- 2000.

Resultados y discusión

El análisis de varianza detectó significancia estadística a una $p < 0.05$ entre los diferentes tipos de crecimiento del hongo por huerta y por localidad, Tabla 2.

Tabla 2. Análisis de varianza para la cantidad de esporas x mililitro del hongo *Botrytis cinerea* en medio selectivo PDA

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	10	3.874542	0.387454	17.7579	0.000*
Error	11	0.240005	0.021819		
Total	21	4.114548			

• Significancia estadística a una $P < 0.05$

La cantidad de esporas detectada por cada localidad se aprecia en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidad de esporas de *Botrytis cinérea* por mililitro por tratamiento

Localidad	Tratamiento	No. Esporas x ml
Manuel Simental, Localidad 20 de noviembre	T1	2.1 x 10 ⁶ b
Agustín Simental Díaz, Localidad 20 de noviembre	T2	2.4 x 10 ⁶ a
Agustín Simental Cruz, Localidad 20 de noviembre	T3	2.3 x 10 ⁶ b
Consuelo Barros, Localidad el llano	T4	1.9 x 10 ⁶ cd
José natividad Manqueros, Localidad Cardenchos	T5	1.7 x 10 ⁶ de
José Simental Díaz, Localidad Cardenchos	T6	2.5 x 10 ⁶ a
Humberto Batres, Localidad 20 de noviembre	T7	2.1 x 10 ⁶ bc
María Nemesia Díaz, Localidad el Llano	T8	1.4 x 10 ⁶ e
Alejandro Escobedo, Localidad Nixtalpa	T9	1.7 x 10 ⁶ de
Agustín García localidad del Molino	T10	2.6 x 10 ⁶ a
Francisco Lerma Localidad de 20 de noviembre	T11	2.2 x 10 ⁶ b
Total	11	

La mayor cantidad de esporas por fruto detectadas fue en las localidades del Molino y del Llano con un promedio de 2.5×10^6 esporas por mililitro, en estas zonas existe mayor pudrición de la fruta por la presencia del hongo *B. cinerea*.

Diámetro del halo. El mayor crecimiento en diámetro en mm del hongo se detectó en el tratamiento 7, localidad del 20 de noviembre con 27.1×28.6 mm, en contraste el menor crecimiento en diámetro fue en el tratamiento 9, con 1.9×8.5 mm, los resultados se aprecian en la Figura 4.

Localidad	Tratamiento	Diámetro mm
Manuel Simental Localidad 20 de noviembre	T1	6.5 x 12.4
Agustín Simental Díaz Localidad 20 de noviembre	T2	6.2 x 17.5
Agustín Simental Cruz Localidad 20 de noviembre	T3	5.8 x 12.5
Consuelo Barros, Localidad El Llano	T4	7.5 x 8.9
José Natividad Manqueros, Localidad Cardenchos	T5	7.5 x 13.3
José Simental Díaz, Localidad Cardenchos	T6	11.1 x 9.7
Humberto Batres, Localidad 20 de noviembre	T7	27.1 x 28.6
María Nemesia Díaz, Localidad El Llano	T8	16.5 x 21.6
Alejandro Escobedo, Localidad Nixtalpa	T9	1.7 x 10.5
Agustín García Localidad El Molino	T10	1.9 x 8.5
Francisco Lerma Localidad 20 de noviembre	T11	4.5 x 6.9
Total	11	
Media		8.7 x 13.6

Media= 8.7 x 13.6

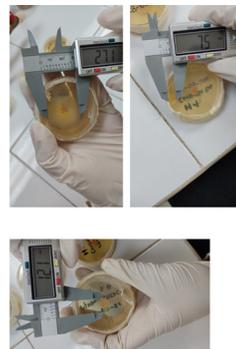


Figura 4. Promedio del diámetro central y ecuatorial del hongo *Botrytis cinérea* en frutos de membrillo

Forma de la colonia. La forma de la colonia del hongo *B. cinerea* en las localidades de prueba fue de 30% amorfa, 30% ovalada, 20% semi círculo y 20% circular. La forma más característica de este hongo es circular (Figura 5).

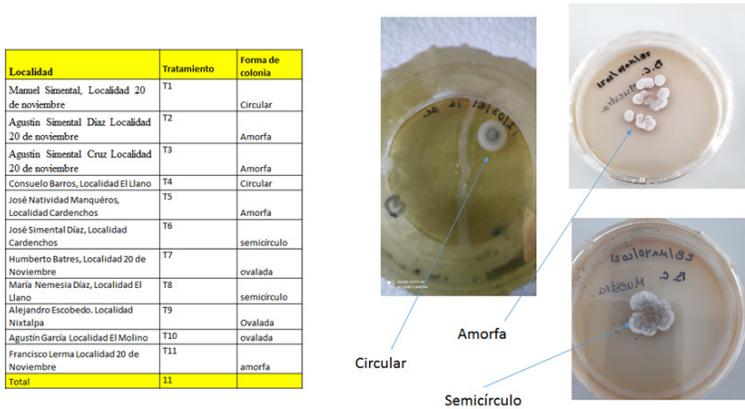


Figura 5. Forma de la colonia de *Botrytis cinérea*

Color del micelio. Predomina el color crema sobre el blanco (Figura 6).

Color del micelio

Localidad	Tratamiento	Color de micelio
Manuel Simental, localidad 20 de noviembre	T1	Crema
Agustín Simental Díaz, localidad 20 de noviembre	T2	Crema
Agustín Simental Cruz, localidad 20 de noviembre	T3	Crema
Consuelo Barros, Localidad El Llano	T4	Blanco
José Natividad Manqueros, Localidad Cardenchos	T5	Crema
José Simental Díaz, Localidad Cardenchos	T6	blanco
Humberto Batres, Localidad 20 de Noviembre	T7	crema
María Nemesia Díaz, Localidad El Llano	T8	blanco
Alejandro Escobedo, Localidad Nixtapa	T9	Crema
Agustín García Localidad El Molino	T10	blanco
Francisco Lerma Localidad 20 de Noviembre	T11	Crema
Total	11	

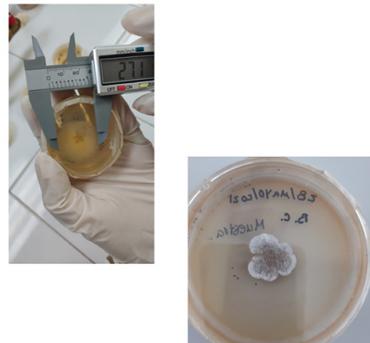


Figura 6. Color del micelio del hongo *Botrytis cinérea*

Terrones *et al.* (2019) encontraron en frutos de zarzamora que el diámetro del micelio fue de 7 a 15 mm, muy diferente al diámetro máximo encontrado en este trabajo con 27.1 mm y con un 45% de coloración gris claro. Para este trabajo la coloración mayor fue de color crema. La forma de los esclerocios varió, en 66.67% fueron irregulares y 33.33% redondos. En este trabajo la forma fue irregular, no predominando una forma en específico, de amorfo a circular.

Conclusiones

La mayor respuesta a la presencia de *B. cinerea* es en la zona norte de la localidad del 20 de noviembre. PDA es un medio selectivo para detectar *B. cinerea* y otros hongos en frutos de pomáceas. La presencia del hongo en el fruto se debe principalmente a que los productores no recogen la fruta caída podrida, la falta de podas oportunas en el mes de febrero, la falta de fertilización a base de calcio y potasio que previenen la aparición de enfermedades, dando resistencia a la raíz, y el exceso de humedad en la etapa de floración son factores que propician la diseminación del hongo en las localidades.

Agradecimientos

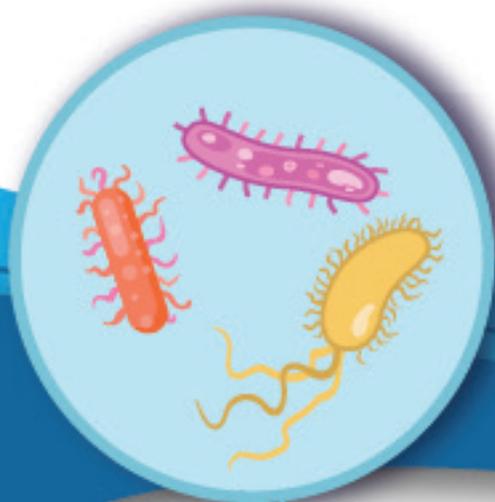
Al Consejo estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango, por el financiamiento del proyecto.

Referencias

- Agrios, G. N. (2004). *Fitopatología*. Limusa.
- Buitrón, B. J. L. (2012). *Estandarización y optimización de Técnicas Moleculares para la detección de Botrytis cinérea, Ralstonia solanacearum y CMV (Cucumber mosaic cucumovirus) en rubros agrícolas de interés para el INLAP* [tesis de ingeniería, Escuela Politécnica del Ejército]. Repositorio Institucional ESPE. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/5982>

- Carrera, M. M. & B. J. Mateo (2005). *Prontuario de Agricultura. Cultivos Agrícolas*. MundiPrensa.
- Muñoz R. A. (2005). *Polinización de cultivos*. MundiPrensa.
- NOM-021-RECNAT- 2000. *Diario oficial de la federación*. 31 de diciembre de 2002.
- Olivares, Sáenz, E. (1996). *Software de diseños experimentales, versión 2.1*. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rioja, M., R. G. Finlay and B. Latorre. (2000). *Variabilidad en la respuesta a la temperatura de incubación observada en aislamientos de Botrytis cinérea* [ponencia]. X Congreso de Fitopatología, Valdivia, Chile.
- Segura M. S. y R. J. Torres. (2009). *Historia de las plantas en el Mundo Antiguo*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad de Deusto.
- Terrones-Salgado, José, Nieto-Ángel, Daniel, Nava-Díaz, Cristian, Téliz-Ortiz, Daniel, García-Velasco, Rómulo, Vallejo-Pérez, Moisés Roberto, & Sánchez-García, Prometeo. (2019). Botrytis cinérea causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(3), 365-382. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>

Biotecnología **pecuaria y acuícola**



INTRODUCCIÓN

En los países de América Latina y el Caribe la actividad ganadera representa uno de los pilares para la seguridad alimentaria de la región, contribuyendo casi a la mitad del producto interno bruto agropecuario, de acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. La relevancia de este sector para la región va de la mano de numerosos trabajos de investigación desde diversas áreas de la biotecnología, abordando prácticamente todos los aspectos en la producción animal: desde la mejora en el valor nutricional de los alimentos y su digestibilidad, el desarrollo de biológicos para el control de enfermedades infecciosas, hasta el uso de la edición génica para modificar atributos que incrementen el bienestar animal, como reducir el estrés generado por las prácticas de manejo convencionales hasta obtener individuos resistentes a enfermedades infecciosas.

En esta sección se presentan dos estudios. El primero de ellos está relacionado con la complementación de la dieta habitual de ganado bovino con una especie vegetal y su efecto en las poblaciones de especies bacterianas metanogénicas que contribuyen a la emisión de gases de invernadero, así como en la emisión de metano. El segundo trabajo reporta la identificación de genes de resistencia a antibióticos en los genomas de cinco especies de bacterias entéricas que se encuentran de manera común en explotaciones porcinas y su variabilidad en estos genomas analizados mediante la utilización de herramientas bioinformáticas, discutiendo finalmente las posibles implicaciones de los hallazgos.

PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS METANOGÉNICAS DE DOS RACIONES PARA BOVINOS *In vitro*

J. Natividad Gurrola Reyes^{1*}, Karina Aidé Araiza Ponce² y Manuel Murillo Ortiz²

RESUMEN

La producción entérica de metano en rumiantes causa problemas ambientales y representa una pérdida de energía para los animales. Con la manipulación de la dieta de los rumiantes es posible modificar la metanogénesis, dado el efecto positivo que tiene el balance de dietas con la adhesión de leguminosas y otras especies arbóreas, en la producción de metano. El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la inclusión de orégano *Lippia graveolens* (Kunth) en una dieta para bovinos, sobre la prevalencia de bacterias metanogénicas y la producción de metano *in vitro*. Se evaluaron ocho tratamientos con dos relaciones forraje: concentrado (50:50 y 60:40), se adicionó *L. graveolens* a tres concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5% y un Testigo) del contenido de aceite esencial e inoculados con líquido ruminal de bovino y fermentadas por 24 horas a baño maría (39°C). Se realizó una extracción del ADN total de los diferentes tratamientos y se amplificó el ADN microbiano de los metanógenos con el gen *mrcA*, mientras que el ARNr 16S se empleó para bacterias totales y cuatro cebadores para género de metanógenos. El análisis de poblaciones se realizó mediante qPCR. Los datos de la estructura poblacional de bacterias metanogénicas nos muestran que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) tanto para raciones como para tratamientos. El análisis de correlación de los metanógenos con la producción de metano es bajo

¹ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR IPN Unidad Durango, Sigma 119 Fracc. 20 de nov. II. Durango, Dgo., México. 34220. * ngurrola@ipn.mx

² Universidad Juárez del Estado de Durango. UJED-FMVZ. Carr. Durango-Mezquitil km 11.5, Durango, Dgo., México. 34000

(-0.1331). De los grupos de metanógenos solamente amplificaron dos: el orden de Methanobacteriales y orden para Methanomicrobiales. La producción de CH₄ disminuyó ($p < 0.05$) con la adición de orégano en los Tratamientos 2 y 4. Las diferencias observadas en las comunidades metanogénicas, ya sea una reducción o un aumento en la abundancia de metanógenos, no es un criterio para evidenciar los cambios en la metanogénesis.

PALABRAS CLAVE

Arqueas, Bacterias metanogénicas, Orégano, *Lippia graveolens*, Metano.

Introducción

Se estima que la población mundial de rumiantes produce alrededor del 15% de las emisiones totales de metano (CH₄) (Króliczewska *et al.*, 2023). La producción de CH₄ para los rumiantes representa una pérdida energética del 2 al 15% de la ingesta bruta de energía (Önel *et al.*, 2021). Es por esto que la reducción en la metanogénesis permite mejorar la calidad nutricional y reducir la emisión de gases de efecto invernadero (Haque, 2018). Las características de la dieta tienen un efecto sobre la producción de CH₄. De manera general, sistemas con pocas limitaciones alimentarias reportan menores emisiones y mayor eficiencia energética (Eugène *et al.*, 2021). Algunos estudios reportan reducciones en la síntesis de CH₄ al incluir leguminosas forrajeras y arbóreas en la dieta, generalmente, debido a la presencia de taninos condensados y aceites esenciales (Suwignyo *et al.*, 2021). Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se derivan de la presencia de pequeños compuestos fenólicos y terpenoides como el limoneno, los monoterpenos, el timol o el carvacrol (Delgadillo-Ruiz *et al.*, 2021), estos compuestos adicionados en bajas concentraciones pueden mejorar la fermentación ruminal (Zhang *et al.*, 2021). En un estudio *in vivo* Wang *et al.* (2009); Liu, *et al.*, (2019) demostraron que la inclusión de 0,25 g / día de mezcla de aceite esencial de plantas de orégano en la dieta de las ovejas redujo de manera considerable el CH₄. Benchaar *et al.* (2007) reportan que carvacrol (1,000 µL/L)

disminuyó la producción total de CH_4 , pero los compuestos fenólicos carvacrol, timol y eugenol afectaron la fermentación ruminal. Martínez *et al.*, (2013) también reportan un efecto fuerte e inespecífico del carvacrol, en su estudio, este disminuyó los ácidos grasos volátiles (AGV) y la producción total de gas, dosis altas de linalol (1,000 μL / L) disminuyen la producción de CH_4 , los AGV, totales y proporción de propionato, pero aumenta la de butirato. Por su parte, Hristov *et al.* (2013) demostró que adherir 250 a 750 g de hoja de orégano/vaca por día a la suplementación con orégano no modifica el pH del rumen, la concentración de AGV, pero disminuyó la concentración de amoníaco y la producción de CH_4 . Sin embargo, debido a que el rumen es un ecosistema complejo, el análisis de la influencia de los componentes de las plantas sobre las poblaciones de metanógenos debería tener en cuenta no sólo la población total de metanógenos, sino también los diferentes órdenes o las especies individuales (Cieslak *et al.*, 2013). El propósito del estudio fue determinar la prevalencia y caracterización de bacterias metanogénicas de dos raciones complementadas con orégano *Lippia graveolens* Kunth. para bovinos *in vitro*.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Juárez del estado de Durango y el CIIDIR IPN Unidad Durango. Se utilizó orégano *Lippia graveolens*, (Kunth.) recolectado en Paura del municipio de Mezquital, Durango, a los 23°41'53" de latitud norte y 104°20'47.8" de longitud oeste una altitud de 1911 msnm. Dos raciones (50:50 y 60:40) se formularon para cubrir los requerimientos de bovinos en mantenimiento y se complementaron con la adición de orégano *L. graveolens* al 0.5%, 1.0% y 1.5% del contenido de aceite esencial. Se elaboraron ocho tratamientos, cuatro para la ración 50:50: T1 Control, Heno de alfalfa (50%), Maíz molido (35%), Harinolina (14%) y Minerales (01%); T2, con 0.5% de aceite; T3, con 1.0% de aceite y T4, con el 1.5% de aceite. Y cuatro para la ración 60:40: T5, control, Heno de alfalfa (60%), Maíz

molido (25%), Harinolina (14%) y Minerales (01%) T6, con 0.5% de aceite; T7, con 1.0% de aceite y T8, con el 1.5% de aceite.

El líquido ruminal se obtuvo de dos novillos de Raza Brangus de 750 kg de peso vivo y con fistula ruminal alimentados con henos y fuentes proteicas *ad libitum*. Para la inoculación de los tratamientos se mezcló un gramo de muestra con 120 ml de líquido ruminal y saliva artificial (1:2) y fermentados por 24 horas a baño maría (39°C). La producción de gas *in vitro* se determinó mediante un sistema semiautomatizado ANKON equipado con transductores electrónicos (ANKOM Technology, Fairport, NY-USA) (Theodorou *et al.*, (1994). A las 24h de la fermentación, se permitió el desahogo del gas producido hacía un medidor portátil de gases (GEM5000, LANDTECH, USA) para evaluar el contenido de CH4 y CO2.

Extracción de ADN

Se utilizó la técnica propuesta por Rojas *et al.* (2008), se amplificó a partir del ADN total. Para los metanógenos se utilizó el gen *mrcA* (metil coenzima-M reductasa); mientras que el ARNr 16S se empleó para bacterias totales (Denman *et al.*, 2007). Se utilizó un conjunto de cebadores para la amplificación de cuatro órdenes de metanógenos (Yu *et al.*, (2005), citado por Kim *et al.*, (2013)) Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótidos utilizados para ordenes de metanógenos

Orden	Secuencia (5'-3')	Tamaño ampliación
Methanobacteriales	CGWAGGGAAGCTGTTAGT / TACCGTCGTCCACTCCTT	343 pb
Methanomicrobiales	ATCGRTACGGGTGTGGG / CACCTAACGCRCATHGTTTAC	506 pb
Methanosarcinales	GTA AACGATRYTCGCTAGGT / GGTCCCCACAGWGTACC	354 pb
Methanococcales	TAAGGGCTGGGCAAGT / CACCTAGTYCGCARAGTTTA	337 pb

pb: pares de bases

Yu *et al.* (2005)

Análisis de poblaciones PCR en tiempo real

Las muestras se evaluaron mediante PCR en tiempo real utilizando un sistema StepOne™ Real-Time PCR System de 48 pocillos (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific Corporation, Foster City, CA, USA), se utilizó GoTaq® qPCR Máster Mix (PROMEGA, Madison, WI, USA).

Cuantificación de bacterias totales y bacterias metanogénicas

La cuantificación absoluta se realizó mediante curvas de calibración con el uso de diluciones en serie (dilución 1:10 cantidad máxima 20 ng) de ADN de concentración conocida. Para cada primer se realizó una curva de calibración con cinco concentraciones de ADN conocidas: $2E^1$, $2E^0$, $2E^{(-1)}$, $2E^{-2}$ y $2E^{-3}$ ng/ μ L, y dos replicas por dilución. El número de copias se calculó con la fórmula:

$$16S \text{ rDNA } \left(\frac{\text{copias}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{concentración } 16S \text{ rDNA } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) * 6.023^{23} \left(\frac{\text{copias}}{\text{mol}} \right)}{\text{tamaño del amplicón } 16S \text{ rDNA } (\text{pb}) * 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) / \text{pb}}$$

(Marconell, 2017)

El cálculo de las poblaciones se realizó con la siguiente fórmula:

$$\log_{10} \text{ng ADN} = \frac{(SQ\text{means})(C)(DV)}{(S)(P)}$$

(Angarita *et al.*, 2015)

Resultados y discusión

Producción de gas y CH₄

El suministro de diferentes concentraciones de orégano se reflejó en la producción de gas (Tabla 2). Y la producción de CH₄ sí se vio afectada ($p < 0.05$) con el suministro de orégano en los tratamientos 2 y 4 de la ración 50:50, y T7 y T8 de la ración 60:40, que reflejan una disminución de metano. Al respecto, Olijhoek. *et al.*, (2019) evaluaron el potencial del orégano seco con concentraciones altas y bajas de aceites esenciales para mitigar la producción de metano, pero lo administrado en diferentes dosis no disminuyó la emisión de metano en vacas lecheras. También Gallegos *et al.*, (2019) evaluaron el efecto de extractos de orégano sobre la producción de gas, los AGV y CH₄. El mejor extracto de orégano sobre la mitigación de metano fue el oleoso al reducir la producción de CH₄, de manera considerable.

Tabla 2. Producción de gas y metano de fermentaciones ruminales *in vitro*

	Tratamientos							
	Ración 50:50				Ración 60:40			
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
PG _{24h} (ml/gMS)	100.06a	101.29a	108.26a	106.17a	98.24a	98.08a	81.21b	84.32b
CH ₄ (ml/gMS)	12.41a	11.44ab	12.20a	11.89a	11.68ab	11.60ab	8.81c	10.07bc

PG₂₄ = Producción de gas *in vitro* a las 24 h de fermentación *in vitro*.

Obtención de ADN

De todas las extracciones se obtuvo una concentración de ADN suficiente (> 1 ng/ μ L). La pureza de las muestras presentó valores muy cercanos a 1,8 para la ratio 260/280. En la cuantificación de metanógenos por qPCR, la recta de calibrado para bacterias totales presentó un R² de 0.995 y de 0.999 para bacterias metanogénicas. Para bacterias totales se obtuvo una eficiencia de 89.702% y para metanogénicas de 88.61%.

Poblaciones microbianas ruminales

Las poblaciones ruminales en la ración (50:50) (Tabla 3) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los distintos tratamientos, tanto para bacterias totales como metanógenas. El testigo muestra la menor cantidad de bacterias metanogénicas respecto a los demás tratamientos, pero también registró la mayor producción de CH_4 (Tabla 2). En contraparte, el T4 mostró la mayor cantidad de bacterias metanogénicas (Tabla 3) y fue el segundo en la producción de CH_4 (Tabla 2), el T2, segundo de la cantidad de bacterias metanogénicas, es el tratamiento que presentó la menor producción de CH_4 . Al respecto, Benchaar *et al.* (2023) y Delgadillo-Ruiz *et al.* (2021) describen dos mecanismos para explicar el efecto anti metanogénico de los aceites esenciales. Uno directamente relacionado con la actividad antimicrobiana de los aceites, por lo cual al incluir aceite de orégano reduce la población de bacterias metanogénicas y, por lo tanto, la síntesis de CH_4 ; el segundo mecanismo se atribuye a la reducción en la población de protozoarios, dado que existe evidencia sobre la relación entre los protozoos y las arqueas metanogénicas, y su importante papel en la formación CH_4 en el rumen ((Ónel *et al.*, 2021; Wallace *et al.*, 2017).

En la ración 60:40 (Tabla 3) las poblaciones de bacterias ruminales muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$), se puede observar que los valores de los tratamientos 7 y 8 de las bacterias metanogénicas son más altos que el Testigo (T5), a pesar de ello los resultados de producción de Gas y CH_4 son bajos. Los tratamientos 5 y 6 presentan la mayor producción, pero las poblaciones arqueales más bajas que los dos restantes (Tabla 2 y 3).

Tabla 3. Poblaciones microbianas ruminales de bovinos, ración 50:50 y 60:40

Población	Tratamientos							
	Ración 50:50				Ración 60:40			
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Bacterias totales Log [ng DNA g^{-1} CR]	4.41	5.37	5.63	10.23	7.40	6.96	7.50	9.35
Bacterias metanogénicas Log [ng DNA g^{-1} CR]	4.13g	4.96f	5.07f	9.51a	6.77d	6.55e	7.03c	8.67b
Valor p		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

El análisis de correlación de los metanógenos con la producción de CH₄ es de -0.1331; con la producción de gas, -0.2333. Los datos concuerdan con lo expuesto por Angarita *et al.* (2015), donde las poblaciones microbianas no son afectadas por la inclusión en la dieta de *Leucaena*, con contenido de rumen de ADN g-1 de 5.8, 3.5 y 5.3 ng para bacterias totales, metanógenos y *B. fibrisolvens*, respectivamente. Montoya, *et al.* (2020) concluyen que la inclusión de hojas secas de *Leucaena* no tiene un efecto ($p > 0.05$) en las poblaciones de arqueas. Y la proporción de metanógenos: población bacteriana no fue alterada ($p > 0.05$). En este mismo orden de ideas, Zhou y Hernández (2010) concluyen que al evaluar dos dietas, una de baja densidad energética y otra de alta densidad energética, la población total de metanógenos no cambió en respuesta a las diferentes dietas ($P > 0.05$).

Caracterización de metanógenos

De la amplificación de órdenes de bacterias metanogénicas solamente amplificaron dos: el orden de Methanobacteriales y orden para Methanomicrobiales. El orden Methanobacteriales es el más abundante y lo conforman los géneros: Methanobrevibacter, Methanosphaera y Methanobacteria, (Faridi y Saba, 2019). Al respecto, Kim, *et al.* (2013), con el uso de agujas de pino (*Pinus densiflora*) y extractos de hojas de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) para mitigar la producción de CH₄, encontró que el orden Methanococcales y el orden Methanosarcinales no se detectaron en el estudio en ninguna de las mezclas incubadas. En otro estudio Behlke (2007) tampoco pudo detectar el orden Methanococcales y el orden Methanosarcinales e informó que estos dos órdenes no estaban en el rumen o eran inferiores al límite de detección. Según Janssen y Kirs (2008), una gran parte (92.3%) de las arqueas ruminales se pueden ubicar en tres clusters a nivel de género, Methanobrevibacter (61.6%) del orden Methanobacteriales, Methanomicrobium (14.9%) del orden Methanomicrobiales y un gran grupo de arqueas ruminales no cultivables; sin embargo, según Behlke (2007), los órdenes de los metanógenos no se correlacionan consistentemente con los cambios en la producción de CH₄.

Conclusiones

En este estudio se expresa la probable asociación entre el "bioma metanogénico" y la eficiencia de la fermentación *in vitro* con líquido ruminal de ganado bovino, con la inclusión de tres concentraciones de Orégano (*Lippia graveolens*), exhibidos sobre la producción de gas y CH₄ para una mejor comprensión del microbioma intestinal ya que la población de metanógenos cambia en respuesta a diferentes dietas. El análisis de los valores de las dos raciones de poblaciones metanogénicas nos muestra que ambas son estadísticamente diferentes, al igual que los tratamientos. El análisis de la ración 50:50 con respecto a la ración 60:40, los resultados son iguales. Sin embargo, las diferencias observadas en las comunidades metanogénicas, ya sea una reducción o un aumento en la abundancia de metanógenos, no es un criterio para evidenciar los cambios en la metanogénesis, ya que esta depende de interacciones con otros microorganismos y el tipo de dieta.

Referencias

- Angarita, E., Molina I., Gonzalo Villegas G., Mayorga J., & Barahona R. (2015). Quantitative analysis of rumen microbial populations by qPCR in heifers fed on *Leucaena leucocephala* in the Colombian Tropical Dry Forest. *Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá*, 37(2), 135-142.
- Behlke, E. J. (2007). *Attenuation of Ruminal Methanogenesis* [dissertation, University of Nebraska]. Repositorio Institucional UNL. https://digitalcommons.unl.edu/animalscidiss?utm_source=digitalcommons.unl.edu%2Fanimalscidiss%2F3&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages
- Benchaar, C., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Wang, Y., Beauchemin, K. A. & McAllister, T. A. (2007). Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. *The Canadian veterinary journal*, 87(3), 413–419. <http://dx.doi.org/10.4141/CJAS07012>

- Benchaar, C., Hassanat, F., Beauchemin, K. A., Ouellet, D. R., Lapierre, H., & Côrtes, C. (2023). Effect of Metabolizable Protein Supply on Milk Performance, Ruminal Fermentation, Apparent Total-Tract Digestibility, Energy and Nitrogen Utilization, and Enteric Methane Production of Ayrshire and Holstein Cows. *Animals*, 13(5), 832.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal*, 7(S2), 253-265.
- Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., Gallegos-Flores, P., Echavarría-Cháirez, F., Meza-López, C., y Gaytán-Saldaña, N. (2021). Modification of ruminal fermentation *in vitro* for methane mitigation by adding essential oils from plants and terpenoid compounds. *Abanico veterinario*, 11, e107. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.9>
- Denman, S. E., Tomkins, N. W. & McSweeney, C. S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), 313-322.
- Eugène, M., Klumpp, K., & Sauvant, D. (2021). Methane mitigating options with forages fed to ruminants. *Grass and Forage Science*, 76(2), 196-204.
- Faridi, F.N. & Saba K. (2019). *Methanogenic Diversity and Taxonomy in the Gastro Intestinal Tract of Ruminants* [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.82829.
- Gallegos F. P., Bañuelos V. R., Delgadillo R. L., Echavarría Ch. F., Meza L. C., & Rodríguez T. D. (2019). Differential evaluation of oregano extracts in the production of volatile fatty acids and methane during ruminal fermentation “*in vitro*”. *Abanico veterinario*. 9, e91. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.91>
- Haque, M. N. (2018). Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of animal science and technology*, 60(1), 1-10.
- Hristov, A. N., Lee, C., Cassidy, T., Heyler, K., Tekippe, J. A., Varga, G. A., B. Corl, B. & Brandt, R. C. (2013). Effect of *Origanum*

- vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1189–1202. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5975>
- Janssen, P. H., & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3619–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.02812-07>
- Kim, E. T., Min, K. S., Kim, C. H., Moon, Y. H., Kim, S. C., & Lee, S. S. (2013). The Effect of Plant Extracts on In-vitro Ruminant Fermentation, Methanogenesis and Methane-related Microbes in the Rumen. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26(4), 517–522. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12480>
- Króliczewska, B., Pecka-Kielb, E., & Bujok, J. (2023). Strategies Used to Reduce Methane Emissions from Ruminants: Controversies and Issues. *Agriculture*, 13(3), 602. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030602>
- Liu, H., Xu, T., Xu, S., Ma, L., Han, X., Wang, X., Zhang, X., Hu, L., Zhao, N., Chen, Y., Pi, L., & Zhao, X. (2019). Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau. *PeerJ*, 7, e7462. <https://doi.org/10.7717/peerj.7462>
- Marconell Alonso, C. (2017). *Estudio de la dinámica poblacional de arqueas metanogénicas en un reactor anaerobio de membranas mediante PCR cuantitativa y métodos microscópicos y su relación con los parámetros operacionales* [tesis de máster, Universitat Politècnica de València]. Repositorio institucional UPV. <http://hdl.handle.net/10251/90999>.
- Cristóbal, C., Hernández, P., Díaz, E., Vásquez, R., García, J., & Rodríguez, P. (2019). *Leucaena leucocephala* (LAM.) DE WIT A KEY SPECIES FOR A SUSTAINABLE BOVINE PRODUCTION IN TROPIC. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2). doi:<http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.2707>
- Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Arango, J., Romano-Muñoz, J. L., Solorio-Sánchez, F. J., Aguilar-Pérez, C. F., & Ku-Vera, J. C. (2020). Effect of Dried Leaves of *Leucaena leucocephala* on Rumen Fermentation, Rumen Microbial Population, and Enteric

- Methane Production in Crossbred Heifers. *Animals*, 10(2), 300. <https://doi.org/10.3390/ani10020300>
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Grevsen, K., Haveman, L. S., Chowdhury, M. R., Løvendahl, P., Weisbjerg, M. R., Noel, S. J., Højberg, O., Wiking, L., & Lund, P. (2019). Effect of dried oregano (*Origanum vulgare* L.) plant material in feed on methane production, rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk fatty acid composition in dairy cows. *Journal of dairy science*, 102(11), 9902–9918. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16329>
- Önel, S. E., Aksu, T., Kalamak, A., Kaya, D. A., Aksu, D. S., Sakin, F., & Türkmen, M. (2021). Effect of Some Essential Oils on *in vitro* Ruminal Fermentation of Alfalfa Hay. *Progress in Nutrition*, 23(S2), e2021250. <https://doi.org/10.23751/pn.v23iS2.12136>
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., & Mena-Martínez, M. E. (2008). A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular biotechnology*, 40(1), 13–17. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9061-8>
- Suwignyo, B., Kurniawati, A., Yebron, M. G. N., y Angeles, A. A. (2022). Legume and Methane Emission Reduction in Livestock. In *6th International Seminar of Animal Nutrition and Feed Science (ISANFS 2021)* (128-133). Atlantis Press.
- Theodorou, M. K., Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B., France J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4), 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Wang, C. J., Wang, S. P., & Zhou, H. (2009). Influences of flavomycin, ropadiar and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation and methane emission from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2-4), 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.03.008>
- Zhang, R., Wu, J., Lei, Y., Bai, Y., Jia, L., Li, Z., Liu, T., Xu, Y., Sun, J., Wang, Y., Zhang, K., & Lei, Z. (2021). Oregano Essential Oils Promote Rumen Digestive Ability by Modulating Epithelial De-

velopment and Microbiota Composition in Beef Cattle. *Frontiers in nutrition*, 8, 722557. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.722557>

Zhou, M. & Hernández-Sanabria, E. (2010). Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3776-3786. <https://doi.org/10.1128/AEM.00010-10>

GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CINCO ESPECIES DE BACTERIAS ENTÉRICAS DE ORIGEN PORCINO: UN ESTUDIO BIOINFORMÁTICO

Javier Rubén Miranda-Valdés¹, Yagul Pedraza-Pérez², Lucero Montserrat Cuautle-García³ y Vianey Marín-Cevada^{1*}

RESUMEN

La expansión significativa de la industria ganadera es una de las principales causas de la resistencia a antibióticos, y tiene, además, un impacto considerable en el medio ambiente y la salud pública. Los desechos y subproductos generados durante la producción de cerdo pueden contener genes de resistencia a antibióticos (ARGs) que pueden transmitirse a los seres humanos a través del consumo, el contacto directo, el entorno o el manejo inadecuado. Esta situación puede resultar en enfermedades zoonóticas, especialmente aquellas que afectan el sistema digestivo. En consecuencia, resulta fundamental comprender la diversidad y cantidad de ARGs con el fin de controlar y rastrear de manera eficaz su propagación. Por lo anterior, se realizó un estudio en el que se analizaron, mediante bioinformática, los ARGs y elementos genéticos móviles (MGEs) en cinco especies bacterianas patógenas y entéricas que son comunes tanto en la microbiota del cerdo como en la del ser humano. Las especies estudiadas fueron *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*. Tras el análisis bioinformático de 1 869 genomas totales de las cinco especies bacterianas mencionadas,

¹ Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. Edificio IC-11, Ciudad Universitaria, San Manuel, 72570 Puebla, México. *vianey.marin@correo.buap.mx

² Decanato de Ciencias Biológicas, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Av. 21 Sur No. 1103, Barrio Santiago, 72410 Puebla, México.

³ Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Ciudad Universitaria, San Manuel, 72570 Puebla, México.

se identificaron un total de 157 genes de resistencia a antibióticos (ARGs). Después de examinar bioinformáticamente un conjunto de 1 869 genomas completos pertenecientes a las cinco especies bacterianas mencionadas, se encontraron en total 157 genes de resistencia a antibióticos (ARGs). La variabilidad de estos genes fue más amplia en *K. pneumoniae*, con 50 de ellos, seguido de *E. coli* con 29, *E. faecium* con 11, *E. faecalis* con 9 y *S. enterica* con 7. Los MGEs más comunes entre estas especies fueron las secuencias de inserción. En vista de estos hallazgos, se recomienda promover y aplicar regulaciones efectivas para controlar la resistencia a los antibióticos a nivel nacional.

PALABRAS CLAVE

Genes de resistencia a antibióticos (ARGs); Elementos genéticos móviles (EGMs); Industria porcina, análisis genómico de bacterias.

Introducción

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones causadas por bacterias, sin tener ningún efecto sobre las infecciones virales. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos es un problema global que está aumentando de manera alarmante. Este fenómeno es resultado de las mutaciones que ocurren en las bacterias debido a la exposición continua a estos medicamentos (WHO, 2020). El término de “genes de resistencia antimicrobiana” (ARGs, por sus siglas en inglés: antimicrobial resistance genes) se ha utilizado desde hace tres décadas. Conforme se ampliaba nuestra comprensión de la base genética de la resistencia antimicrobiana, poco a poco ha cobrado relevancia en el área microbiológica y salud pública, enfocándose en la identificación y caracterización de los ARGs. Por un lado, es importante reconocer que estos genes forman parte de la evolución natural de las bacterias, como lo demuestra su presencia en heces humanas paleolíticas. Sin embargo, por otro lado, nos encontramos ante un problema creciente debido al abuso de antibióticos y a la selección artificial causada por la intervención humana (Zhang *et al.*, 2022). Además, la común e intensiva administración de antibióticos

en la cría de animales, especialmente en prácticas pecuarias y piscícolas, se destaca como una de las principales causas de la resistencia bacteriana. Así mismo, es una práctica común administrar antibióticos a animales sanos con el propósito de prevenir enfermedades y favorecer su crecimiento. Esto a su vez crea un ambiente propicio para el desarrollo y la transferencia de genes de resistencia entre las bacterias presentes en los animales, los seres humanos y el entorno circundante (FAO, 2016).

La mayoría de los antibióticos utilizados en la cría de animales no tienen propósitos terapéuticos, sino que se emplean para estimular el crecimiento y prevenir enfermedades. Estos antibióticos a menudo se detectan en el tracto digestivo del ganado en concentraciones bajas y subletales, lo que ralentiza el crecimiento de las bacterias susceptibles. Como resultado, se genera una presión selectiva que permite que las bacterias en el sistema digestivo del ganado adquieran, conserven y dispersen genes de resistencia a los antibióticos, lo que a su vez lleva a un aumento en la abundancia relativa de poblaciones bacterianas resistentes (He *et al.*, 2020).

La cría de cerdos a nivel mundial genera una cantidad considerable de residuos que, como práctica común, se reutilizan como biosólidos, que son los residuos orgánicos derivados de los desechos de los cerdos, como fertilizantes en la agricultura. Sin embargo, esto plantea un problema importante, ya que se estima que entre el 75% y el 90% de los antibióticos administrados a los cerdos se excretan sin metabolizarse por completo (FAO, 2022). Esto implica el riesgo de transportar residuos de antibióticos, genes de resistencia y bacterias resistentes a múltiples medicamentos, así como hormonas y otros contaminantes. A pesar de ciertos tratamientos, estos elementos persisten y pueden contaminar el suelo en el que se aplican los biosólidos, extendiéndose a áreas cercanas (He *et al.*, 2020; Law *et al.*, 2021). A partir del tratamiento de los lodos residuales, se obtienen los biosólidos, que consisten en una mezcla de materia orgánica rica en nutrientes y agua recuperada. Estos biosólidos se utilizan principalmente como fertilizantes orgánicos (Australian Water, 2020). En contraste, Yang *et al.* (2020) resaltaron la importancia del estiércol porcino como un reservorio significativo de genes de re-

sistencia a los antimicrobianos (ARGs) y elementos genéticos móviles (MGEs). Mediante el uso de qPCR, realizaron un análisis del estiércol de granjas porcinas en China y encontraron que tanto las heces como el estiércol tratado contenían concurrentemente integrones de clase 1 y 2, así como plásmidos conjugativos. Por otro lado, Muurinen *et al.* (2021) investigaron en Estados Unidos la influencia de los antibióticos y promotores de crecimiento alternativos en el resistoma fecal de cerdos, así como la movilidad de los ARGs y su relación con los MGEs. Demostraron que los antibióticos y los promotores de crecimiento alternativos fortalecieron de manera positiva y proporcional los vínculos entre los ARGs y los MGEs. Esto se atribuyó a que las concentraciones subterapéuticas de antibióticos y la inducción de mecanismos de respuesta al estrés bacteriano promueven la transferencia horizontal de genes. En cuanto al destino final de los biosólidos, el suelo es uno de los entornos más susceptibles a la contaminación por las partículas residuales que estos contienen.

Metodología

Búsqueda literaria sobre el uso de antibióticos pecuarios

Se investigaron las generalidades concernientes al uso mundial de antibióticos en la producción ganadera porcina, los genes de resistencia asociados y cuáles son las especies bacterianas entérico-porcinas de importancia clínica para el humano que los contienen.

Selección de especies bacterianas y análisis inicial de ARGs y MGEs

Derivado del paso anterior, se escogieron cinco especies bacterianas: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*. Seguidamente se empleó la base de datos del NCBI para descargar los genomas completos de dichas bacterias presentes únicamente en aislados de origen porcinos. Con el fin de caracterizar los ARGs y MGEs presentes entre ellas, se seleccionaron al azar doce

cepas de cada especie para un análisis inicial de su genoma mediante los programas Resfinder y MGE Finder del Centro de Epidemiología Genómica de Dinamarca.

Búsqueda de genomas de origen porcino

Para complementar los resultados, del NCBI se obtuvieron también las secuencias de proteínas correspondientes a los ARGs de todas las cepas con el fin de efectuar una búsqueda extensa, en todos los genomas descargados, mediante BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool). La comparación de secuencias de proteína aporta más información funcional que la comparación de nucleótidos. Este análisis se hizo para determinar la presencia, diversidad y abundancia de los genes identificados en cada especie en relación con las demás, así como identificar los genes compartidos entre ellas.

Con el objetivo de contar con un número representativo de cepas por cada especie bacteriana para examinar sus ARGs y MGEs, se hicieron curvas de acumulación. Este método se basó en añadir cepas nuevas por especie para la respectiva identificación de nuevos genes de resistencia hasta alcanzar un punto de estabilización; es decir, aquel en que la probabilidad de descubrir nuevos genes fuese baja en comparación con el número total acumulado de genes. Con el uso de esta estrategia se determinó que por cada especie fueron suficientes 18 cepas para hacer el análisis en Resfinder y MGE Finder. Los datos se procesaron en el software ClustalW y se empleó la estrategia de creación de dendrogramas por TreeDyn 198.3 para eliminar las redundancias génicas.

BLAST masivo y análisis de datos

Se empleó un programa desarrollado por Pedraza (Pedraza-Pérez *et al.*, 2018) para realizar un BLAST masivo utilizando 415 secuencias proteicas obtenidas a partir del análisis con Resfinder y MEG Finder obtenidas en el paso anterior. Se buscaron las secuencias en los ge-

nomas de las cinco especies estableciendo como punto de corte los siguientes criterios: e-value menor a $1.00E-06$, identidad superior o igual al 25% y cobertura superior o igual al 40%. Los resultados se presentaron en forma de matrices de presencia/ausencia de genes de resistencia por cepa y especie utilizando el software RStudio.

Resultados y discusión

La revisión general sobre el uso de antibióticos en la industria ganadera mundial reveló la ausencia de regulaciones importantes de estos en México y otros países de América Latina, por lo que se tomaron los datos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Federal de Medicamentos de Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés). En la Figura 1 se muestra una comparación entre las clases de antibióticos que cada agencia tiene aprobadas para su venta destinada a actividades ganaderas. Las diferencias existentes probablemente estén relacionadas con el rigor legislativo de cada área geopolítica y la antigüedad de sus leyes, siendo que Europa fue pionera en esas regulaciones.

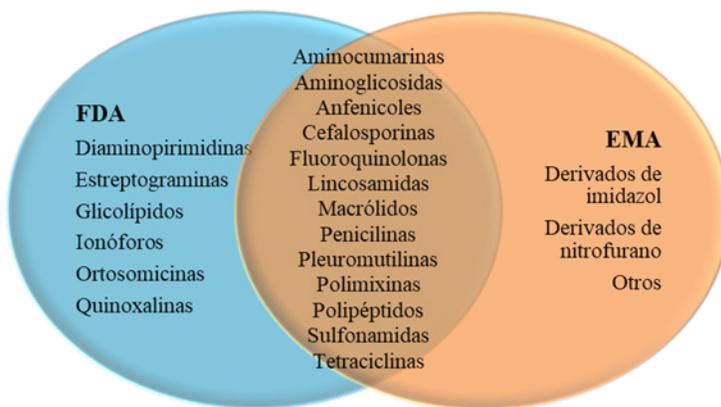


Figura 1: Clases de antibióticos aprobados para la venta destinada a la producción animal en EE. UU. y Europa (FDA, 2020 & EMA, 2020).

Nota: La categoría “otros” de la EMA se compone de los siguientes antibióticos: Fosfomicina, furaltadona, natamicina, nitroxolina y espectinomina de rifaximina.

A posteriori, la búsqueda orientada a conocer cuáles son las bacterias entéricas de origen porcino con mayor potencial patógeno para el ser humano llevó a seleccionar: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*. Como se observa en la Tabla 1, de la base de datos del NCBI se descargaron 1 869 genomas bacterianos de cepas provenientes de aislados de cerdo. Se seleccionó un grupo de dieciocho genomas al azar para ser analizado con los programas Resfinder y MGE Finder en busca de genes de resistencia a antibióticos. Las secuencias encontradas en este análisis fueron usadas como secuencias de entrada para realizar una búsqueda extensa, mediante BLAST, en todos los genomas descargados.

Tabla 1. Resumen de los datos de secuencias proteicas de las bacterias analizadas para efectuar el BLAST masivo. *Aquellos con anotación de gen/proteína. **Aquellos cuya secuencia es única y no se repite

Especie bacteriana	Genomas totales	Genomas de aislados de origen porcino	Genomas candidatos*	ARGs encontrados	ARGs únicos**
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16608	52	32	86	50
<i>Escherichia coli</i>	28924	1502	201	39	29
<i>Enterococcus faecium</i>	2755	46	41	12	11
<i>Enterococcus faecalis</i>	2211	48	31	11	9
<i>Salmonella enterica</i>	13676	221	90	9	7

El análisis dio como resultado los datos mostrados en la Figura 2. De mayor a menor, el número de ARGs encontrados por especie fue: *K. pneumoniae* (50), *Escherichia coli* (29), *Enterococcus faecium* (11), *Enterococcus faecalis* (9) y *Salmonella enterica* (7).

Genes de resistencia a antibióticos en cinco especies de bacterias entéricas...

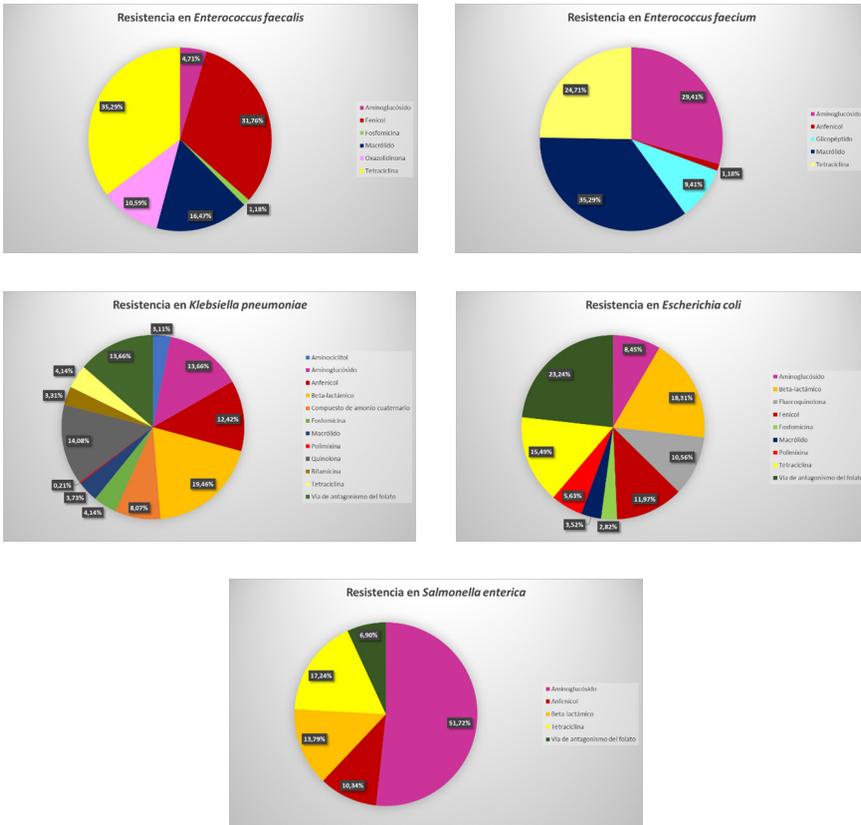


Figura 2. Distribución de la resistencia a antibióticos en las cinco especies bacterianas

Al revisar la diversidad (relación entre riqueza y abundancia) de ARGs albergados en las bacterias analizadas, se observa un patrón que correlaciona positivamente (exhibiendo mayor riqueza) con la cantidad de genes de resistencia distintos que cada especie bacteriana posee, puesto que *K. pneumoniae* lidera la lista de riqueza génica al tener resistencia desarrollada hacia doce distintos grupos de antibióticos y un gran número de genes asociados. Le sigue *E. coli* con resistencia hacia nueve grupos de antibióticos, *E. faecalis* hacia ocho, *E. faecium* hacia siete y *S. enterica* hacia cinco (Figura 2). Sin embargo, el orden cambia ligeramente al evaluar la abundancia porque, si bien *E. faecalis* tiene una mayor riqueza de ARGs, *E. faecium* tiene mayor abundancia.

Se observa que la abundancia y diversidad de las dos especies de *Enterococcus* es semejante, como pudiera esperarse debido a que son del mismo género. *K. pneumoniae* es de las especies bacterianas con mayor resistencia desarrollada, hecho que se ratifica en este estudio. Por su parte, los resultados sobre la diversidad de ARGs en *E. coli* se pueden comprender como un efecto de su distribución cosmopolita. El estudio metagenómico de Zhang *et al.* (2022) sobre seis distintos hábitats dio a conocer la presencia de 2561 ARGs que confieren resistencia a 24 clases de antibióticos a partir de 4572 muestras. Ese trabajo comprobó que el 23.78% de los ARGs hallados suponen un riesgo para la salud, particularmente por aquellos que confieren multiresistencia. Asimismo, se incluyó un importante análisis que expone los patrones de distribución a los ARGs en el mundo, el cual destacó a las regiones de primer mundo (como Europa y Estados Unidos de América) por acoger la mayor cantidad, circunstancia que coincide también con la de albergar a la mayoría de los países con mayor producción pecuaria.

Conclusiones

En cuanto al sector porcícola, los antibióticos más comúnmente administrados según la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) abarcan los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, las lincosamidas, los macrólidos y las tetraciclinas. Al examinar la cantidad de genes de resistencia, se elaboró una lista de especies bacterianas que se destacan en este sentido: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella enterica*. Se observó una correlación directa y proporcional entre el número de genes de resistencia y el uso intensivo de estos grupos de antibióticos, los cuales generan resistencia en las bacterias. Adicionalmente y en ciertos casos, se encontró una relación entre el número de genes de resistencia y la presencia de elementos genéticos móviles (MGEs) en las cepas bacterianas analizadas.

Agradecimientos

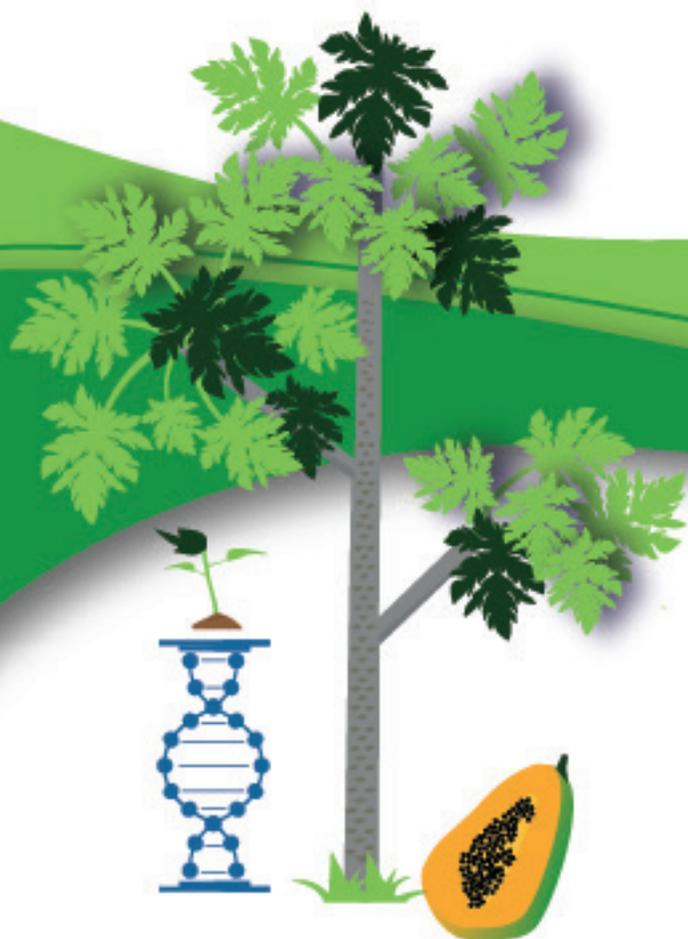
Este trabajo fue financiado parcialmente por la empresa de producción porcina “Granjas Carroll de México, S. de R.L. de C.V. bajo el proyecto titulado: “Diagnóstico y evaluación de estudios de efectividad biológica, de productos derivados de Granjas Carroll S. de R.L. de C.V.” Asimismo, el autor principal expresa su agradecimiento al Posgrado en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por la beca al estudiante al concluir sus estudios de posgrado proporcionado en el desarrollo de este trabajo.

Referencias

- Australian Water (2020). *What are biosolids?* Australia: Australian & New Zealand Biosolids Partnership.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production*. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). *Animal production*. <https://www.fao.org/antimicrobial-resistance/key-sectors/animal-production/en/>
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., & Alvarez, P. J. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *NPJ Clean Water*, 3(1), 4.
- Law, A., Solano, O., Brown, C. J., Hunter, S. S., Fagnan, M., Top, E. M., & Stalder, T. (2021). Biosolids as a source of antibiotic resistance plasmids for commensal and pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 606409.
- Muurinen, J., Richert, J., Wickware, C. L., Richert, B., & Johnson, T. A. (2021). Swine growth promotion with antibiotics or alternatives can increase antibiotic resistance gene mobility potential. *Scientific Reports*, 11(1), 5485.

- Pedraza-Pérez, Y., Cuevas-Vede, R. A., Canto-Gómez, Á. B., López-Pliego, L., Gutiérrez-Ríos, R. M., Hernández-Lucas, I., Rubín-Linares, G., Martínez-Laguna, Y., López-Olguín, J. F., & Fuentes-Ramírez, L. E. (2018). BLAST-XYPlot Viewer: A Tool for Performing BLAST in Whole-Genome Sequenced Bacteria/Archaea and Visualize Whole Results Simultaneously. *G3 (Bethesda, Md.)*, *8*(7), 2167–2172. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200220>
- World Health Organization (2020). *Antibiotic resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Yang, F., Han, B., Gu, Y., & Zhang, K. (2020). Swine liquid manure: a hotspot of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes. *Scientific Reports*, *10*(1), 15037.
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, T., Xu, N., Lu, T., Hong, W., Penuelas, J., Gillings, M., Wang, M., Gao, W., & Qian, H. (2022). Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nature communications*, *13*(1), 1553. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29283-8>

Biotecnología y sostenibilidad de sistemas productivos



INTRODUCCIÓN

En el mundo se enfrentan muy diversos retos relacionados con los patrones productivos actuales. El uso y explotación de recursos fósiles ha demostrado un alto impacto negativo en las condiciones medio ambientales, debido a la degradación y destrucción de ecosistemas muy diversos y al poco control que se tiene sobre las emisiones de gases de efecto invernadero. La inminente crisis medioambiental apunta a la existencia de límites al crecimiento productivo, resultado del proceso de industrialización. Ello significa que se requiere de un cambio urgente en la forma en el qué y cómo se produce, ya que si los países en desarrollo siguen el sendero de desarrollo productivo que recorrieron los países industriales desarrollados, el mundo enfrentará una explosión sin precedentes del uso antropogénico de recursos a nivel global.

Esta alerta y urgencia representa una oportunidad para que, desde la Biotecnología, se ofrezcan caminos alternativos ya que existe una amplia diversidad de aspectos, a través de los cuales la Biotecnología puede contribuir a que los sistemas productivos transiten hacia procesos y productos más sostenibles. Así como contribuir a la solución de problemáticas que ya se enfrentan en una amplia diversidad de cultivos, como resultado del cambio climático, la degradación de los suelos, la erosión, etcétera.

En este sentido, el capítulo que compone este apartado presenta un análisis sobre los mecanismos de tolerancia al calor para el desarrollo de cultivares más resistentes al estrés térmico. En particular, el análisis se aplica a los cultivos que se ven afectados por los cambios asociados al cambio climático, tales como: alteraciones en los patrones de lluvia, sequías y temperaturas extremas. Problemas que se observa son cada vez más frecuentes en una amplia variedad de cultivos diversos.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LA RESPUESTA A ESTRÉS POR ALTA TEMPERATURA EN *CARICA PAPAYA* CV MARADOL Y SILVESTRE

Tiffany Cevallos Vilatuña¹ y Jorge M. Santamaría^{1*}

RESUMEN

Los cultivos se ven afectados por cambios en los patrones de lluvia, temperaturas extremas, sequías y otros fenómenos climáticos. Las altas temperaturas pueden provocar estrés térmico en los cultivos durante las olas de calor, lo que afecta negativamente su desarrollo, floración y producción de frutos. Por consiguiente, entender los mecanismos de tolerancia al calor es fundamental para el desarrollo de cultivares más resistentes al estrés térmico. Esto contribuye a la producción sostenible de alimentos y asegura que se pueda satisfacer las demandas alimentarias en un contexto de cambio climático. Debido a la importancia agronómica de papaya, se propuso evaluar el efecto de estrés por alta temperatura (2h a 50°C) sobre la fisiología de dos genotipos de *C. papaya* cv Maradol y silvestre. Los resultados indicaron que el genotipo silvestre demostró una mayor eficiencia fotosintética al recuperarse un 52% más que el genotipo Maradol. Así mismo, el análisis de curvas OJIP reveló un menor daño del PSII en silvestre. Adicionalmente, este genotipo mostró un aumento del 175% en la conductancia y del 62% en la transpiración, lo que podría estar relacionado con un mejor mecanismo de enfriamiento y protección de las hojas contra el calor, lo que ayuda a mantener la función fotosintética. Por otro lado, el genotipo Maradol experimentó mayor disminución en el potencial hídrico en comparación con el genotipo silvestre. Los datos obtenidos sugieren que el genotipo comercial,

¹ Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Unidad de Biotecnología, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, México 97205. *jorgesm@cicy.mx.

debido al proceso de domesticación, podría haber perdido parte de su tolerancia a altas temperaturas presente en los genotipos silvestres.

PALABRAS CLAVE

Fluorescencia, fotosíntesis, conductancia, transpiración, tolerancia a altas temperaturas.

Introducción

Las olas de calor cada vez más frecuentes e intensas pueden tener efectos devastadores en los cultivos y en la productividad agrícola en general. Cuando las plantas se enfrentan a estrés abiótico o biótico, su crecimiento, desarrollo y productividad pueden ser afectados negativamente (Zhao *et al.*, 2021).

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila son herramientas clave en la investigación de la fotosíntesis y el análisis de los efectos de diferentes tensiones ambientales en las plantas. Estos parámetros proporcionan información sobre el estado y la eficiencia del fotosistema II (PSII), que es el complejo de proteínas responsable de la captura de luz y la conversión de la energía lumínica en energía química durante la fotosíntesis (Kumar *et al.*, 2020).

De igual forma, las curvas de fluorescencia, también conocidas como prueba OJIP, proporcionan información detallada sobre la bioenergética y las interacciones de los componentes individuales del PSII. Además, se ha utilizado la cinética OJIP para el cribado de diferentes variedades de cultivos sometidos a estrés por calor o sequía, lo que proporciona información valiosa para seleccionar variedades más resistentes a estos tipos de estrés (Zhu *et al.*, 2021).

Por otro lado, las plantas silvestres han sobrevivido y evolucionado en entornos difíciles a lo largo del tiempo, lo que ha llevado al desarrollo de rasgos y mecanismos de tolerancia al estrés. Estos rasgos pueden incluir mayor resistencia al calor, mayor estabilidad de la Rubisco, mejor regulación del equilibrio energético y mayor capacidad para proteger las estructuras fotosintéticas del daño (Jedmowski & Bruggemann., 2015).

La comprensión de estos mecanismos adaptativos es fundamental para el desarrollo de estrategias de cultivo y manejo de cultivos más resistentes al estrés y para la mitigación de los impactos del cambio climático en la agricultura.

En este capítulo se examinó cómo el estrés causado por altas temperaturas afecta las características físicas y los parámetros fisiológicos de las plantas de papaya comercial y silvestre. Estos parámetros incluyeron aspectos relacionados con la fotosíntesis, la fluorescencia, la integridad de la membrana, el potencial hídrico y el contenido de prolina. El objetivo fue determinar el nivel de tolerancia al calor en plantas jóvenes de *C. papaya* cv Maradol y silvestre.

Metodología

Las semillas del cultivar Maradol se obtuvieron de la casa comercial Semillas del Caribe. Por otro lado, las semillas del genotipo silvestre se obtuvieron a partir de una recolección previa de frutos en diferentes localidades poco perturbadas del estado de Yucatán, México. Las plantas crecieron bajo condiciones de invernadero con una densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) de $1000\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 13h luz y 11h obscuridad equipado con aire acondicionado, lo que permitió mantener una temperatura cercana a 25°C durante todo el experimento. Las plantas se regaron diariamente con 100ml de agua por cada maceta.

Plantas jóvenes Maradol y silvestre de 115 días de edad se seleccionaron para el ensayo de estrés térmico, el cual se llevó a cabo dentro de una cámara térmica diseñada previamente en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Los grupos se distribuyeron de la siguiente manera: control en condiciones de invernadero ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$); control de la cámara térmica (25°C por 2h) y su recuperación después de 168h ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con riego constante; tratamiento de estrés térmico (50°C por 2h) dentro de la cámara térmica y su recuperación ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 168h) con riego constante. Para todos los tratamientos se utilizaron tres réplicas biológicas.

La emisión de fluorescencia, medido como F_v/F_m e índice de rendimiento PI_{abs} , se midió con el equipo M-PEA, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK. Los parámetros de intercambio gaseoso: fotosíntesis ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), conductancia ($\text{molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiración ($\text{mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$) y CO_2 intercelular ($\mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$) se midieron a través de un analizador de gases en el espectro infrarrojo, IRGA (LI-6400XT portátil LI-COR, Nebraska, USA).

Los datos de potencial hídrico (Ψ) se midieron con el equipo WP4C, potenciómetro de punto de rocío (Decagon Devices, USA). El porcentaje de pérdida de electrolitos se estimó sumergiendo discos de hojas (0.7mm de diámetro) en agua destilada. La conductividad inicial y final (después de someter los discos a la autoclave por 15 minutos) se midieron con el potenciómetro (ORION modelo 162, USA). Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula: % fuga de electrolitos = $(C1/C2) * 100$.

Finalmente, para la cuantificación de prolina se realizó una curva estándar con L-Prolina en concentraciones de 0.025 a 0.4 μM . Las mediciones se hicieron según el protocolo de Bates *et al.* (1973) con modificaciones. Las diferencias significativas se probaron a través del software R con el paquete R Commander. De acuerdo con la distribución normal de los datos, se utilizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA $p < 0.05$) o un Modelo Lineal Generalizado (GLM $p < 0.05$)

Resultados y discusión

Después de 2 horas de estrés térmico a una temperatura de 50°C, se observaron cambios significativos en el estado fenotípico de las plantas jóvenes (Figura 1). Ambos genotipos mostraron pérdida de turgencia, enrollamiento de las hojas y, en el caso del genotipo Maradol, marchitamiento del tejido en comparación con el grupo control. Estos cambios fueron más pronunciados en el genotipo Maradol que en el genotipo silvestre. Después de un período de recuperación de 168 horas a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con riego constante, se observó una mejor recuperación de la turgencia en las hojas del genotipo silvestre en comparación con el genotipo Maradol.

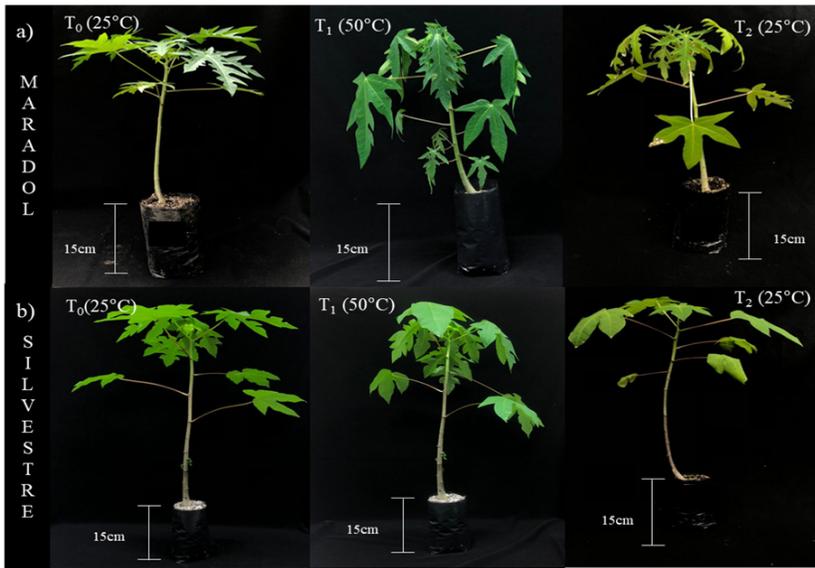


Figura 1. Respuesta fenotípica en plantas jóvenes de *C. papaya* Maradol y Silvestre ante estrés por alta temperatura a: tiempo T_0 (25°C); tiempo de exposición, T_1 de 2h (50 °C) y tiempo de recuperación T_2 de 168h (25°C)

Las altas temperaturas pueden causar daños en los tejidos vegetales y pueden manifestarse como manchas necróticas, decoloración y marchitez y pérdida de turgencia en hojas y tallos (Bita & Gerats, 2013). De hecho, el estrés por alta temperatura perturba el desarrollo y crecimiento de las plantas y, como consecuencia, es un factor limitante para la producción de biomasa y el rendimiento de los cultivos (Jedmowski & Bruggemann, 2015). Fenotípicamente, el genotipo silvestre mostró mejor tolerancia a la alta temperatura que Maradol. Esto puede deberse a varias razones, incluyendo las ventajas evolutivas de la variante silvestre que no ha sido sometida a procesos de domesticación. A lo largo de la evolución, las plantas silvestres han desarrollado mecanismos de defensa y tolerancia que pueden incluir la producción de proteínas de choque térmico, antioxidantes y compuestos protectores que ayudan a mitigar los efectos del estrés por calor (Jedmowski & Bruggemann, 2015).

El análisis de datos para Fv/Fm e índice de rendimiento PI_{abs} no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos control. Sin embargo, después de 2 horas de exposición a 50°C, se observó una disminución significativa en la emisión de fluorescencia, siendo 0.56 para el genotipo Maradol y 0.64 para el genotipo silvestre (Tabla 1). De igual manera, después del estrés a 50°C, se observó una disminución notable en el índice PI_{abs} para ambos genotipos, siendo de 0.50 para Maradol y 1.01 para el genotipo silvestre. En la etapa de recuperación del estrés, el genotipo Maradol no mostró mejoras en el rendimiento de su fotosistema (PI_{abs} 0.92). Sin embargo, el genotipo silvestre incrementó su rendimiento a 5.07, siendo significativamente más alto que la variedad comercial (Tabla 1).

PI_{abs} indica la eficiencia con la que el PSII convierte la energía lumínica en energía química. Representa la proporción de la energía absorbida por el PSII que se utiliza para la fotosíntesis en lugar de disiparse como calor (Kalaji *et al.*, 2016). Según lo obtenido, dos horas de exposición a altas temperaturas son suficientes para afectar negativamente la cadena de transporte de electrones del PSII en la variedad Maradol sin lograr recuperarse. Sin embargo, en el caso del genotipo silvestre, los efectos inducidos por altas temperaturas parecen ser reversibles. Es posible que la variedad silvestre presente mecanismos adaptativos que le permitan enfrentar mejor el estrés térmico y recuperarse más eficientemente.

Tabla 1. Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm); Índice rendimiento PI_{abs}, fotosíntesis ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y CO₂ intercelular, Ci ($\mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$) en plantas de *C. papaya* Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo T0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); tiempo de exposición, T1 de 2h (50°C) y tiempo de recuperación de 7 días (168h) con riego a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 7dR. * indica la diferencia de medias ($p < 0.05$)

	Maradol			silvestre		
	T0	T1	7dR	T0	T1	7dR
Fv/Fm	0.81	0.56*	0.74	0.81	0.64*	0.81
PI _{abs}	10.79	0.50	0.92*	8.38	1.01	5.08*
Fotosíntesis	10.16	0.18	2.98*	9.74	3.94	6.39*
Ci	347.09	371.55	314.56	332.47	383.18	304.30

El análisis de fotosíntesis ($p < 0.05$) reveló que los grupos control mantuvieron valores superiores a $9.73 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, después del estrés, la fotosíntesis del genotipo Maradol disminuyó significativamente en comparación con su control y el genotipo silvestre, alcanzando valores de 0.18 y $3.94 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente. Después del período de recuperación, se observaron diferencias significativas entre genotipos ($2.97 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para Maradol y $6.39 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para el genotipo silvestre). Se evidenció que la fotosíntesis se vio afectada en ambos genotipos; sin embargo, silvestre presentó mejor recuperación que su cultivar comercial (Tabla 1).

Adicionalmente, el análisis de datos ($p < 0.05$) para el flujo de CO_2 intercelular (C_i) mostró que los valores de C_i se mantuvieron constantes en los grupos control. Después de 2 horas de estrés a 50°C , se observó un incremento en C_i ; sin embargo, no hubo diferencias entre los genotipos y los controles ($371.52 \mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$ para Maradol y $383.18 \mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$ para el genotipo silvestre). Después de 168 horas de recuperación se observó un decremento de C_i , sin diferencias significativas (Tabla 1).

Principio del formulario

La enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) es una enzima clave en el proceso de fijación de carbono durante la fotosíntesis. Sin embargo, su eficiencia disminuye a medida que la temperatura aumenta, reduciendo la tasa fotosintética. Esto se debe a una menor especificidad para el CO_2 en comparación con el O_2 y a una mayor disponibilidad de O_2 en condiciones de estrés térmico, lo que limita la capacidad de la planta para fijar carbono y realizar la fotosíntesis de manera eficiente (Yadav *et al.*, 2020).

El análisis de las curvas O-J-I-P ($p < 0.05$) del presente estudio mostró que los grupos control a temperatura de invernadero ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y cámara térmica (25°C) no presentaron diferencias entre genotipos. Sin embargo, después del tratamiento a 50°C se observó que ambos genotipos experimentaron afectación en la emisión de fluorescencia, siendo el genotipo silvestre menos afectado en su PSII,

en comparación con el genotipo Maradol. Al finalizar el período de recuperación para los tratamientos a 50°C, el genotipo silvestre presentó una mejor recuperación de la actividad del PSII, con niveles de fluorescencia más altos (media de 25554.02) en comparación con el genotipo Maradol (media de 21298.06) (Figura 2).

Varios estudios demuestran que el estrés por altas temperaturas altera la tasa de transporte de electrones a través del fotosistema II y puede inhibir el fotosistema I (Zhu *et al.*, 2021; Oukarroum *et al.*, 2016; Oukarroum *et al.*, 2013; Mathur *et al.*, 2011). Se ha sugerido que aquellas plantas que mantienen una eficiencia fotosintética más alta, representada por valores de J-I-P más altos, se considerarían más resilientes al estrés (Zhu *et al.*, 2021).

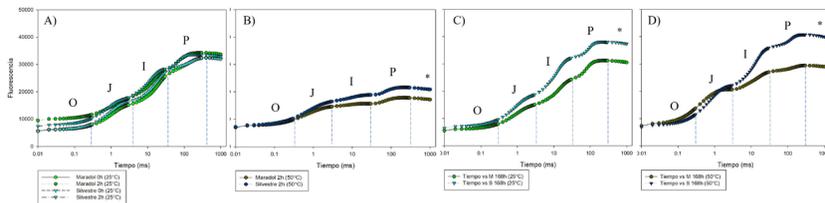


Figura 2. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila polifásica (O-J-I-P transitoria) en plantas de *C. papaya* Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura. A) tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y exposición de 2h a 25°C , B) tiempo de exposición 2h a 50°C , C) tiempo de recuperación 2h a 25°C + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y D) tiempo de recuperación 2h a 50°C + 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). * corresponde a diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos

En nuestro caso, el análisis de datos ($p < 0.05$) reveló que los valores de conductancia y transpiración se mantuvieron similares entre los genotipos Maradol y silvestre en los grupos control T0. Después del tratamiento de estrés, se observó un incremento significativo en la conductancia del genotipo silvestre ($1.41 \text{ molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$). Al finalizar el período de recuperación, ambos genotipos retomaron niveles de conductancia similares a los del control, sin mostrar diferencias entre ellos (Tabla 2). De la misma manera, después del estrés a 50°C , la transpiración en el genotipo silvestre ($14.73 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$) aumen-

tó significativamente, mientras que la transpiración en el genotipo Maradol disminuyó ($1.38 \text{ mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$). Después de 168 horas de recuperación, ambos genotipos presentaron una disminución en la transpiración en comparación con los controles (Tabla 2).

Tabla 2. Conductancia estomática ($\text{molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiración ($\text{mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$) y potencial hídrico (Ψ) en plantas de *C. papaya* Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo T0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$); tiempo de exposición, T1 de 2h (50°C) y tiempo de recuperación de 7 días (168h) con riego a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 7dR. * indica la diferencia de medias ($p < 0.05$)

	Maradol			silvestre		
	T0	T1	7dR	T0	T1	7dR
Conductancia	0.48	0.04*	0.07	0.38	1.41*	0.13
Transpiración	7.24	1.39*	1.17	6.05	14.74*	1.97
MPa	-0.73	-1.22*	-0.74	-0.68	-0.80*	-0.84

Varias investigaciones (Nankishore & Farrell., 2016; Urban *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2022; Bheemanahalli *et al.*, 2022) indican que el incremento de temperatura del aire puede conducir a un aumento en la conductancia y transpiración de las hojas, siempre y cuando el suelo esté adecuadamente regado. Esto significa que las plantas pueden utilizar la transpiración como un mecanismo de enfriamiento para hacer frente a las altas temperaturas. A medida que aumenta la temperatura, el manejo del agua se vuelve aún más crítico. Si el agua es escasa, las plantas cerrarán sus estomas para conservar agua, lo que puede interrumpir los procesos metabólicos y llevar a temperaturas críticas en las hojas.

Los efectos acentuados en los parámetros OJIP observados bajo estrés por alta temperatura indican un posible daño al PSII. Sin embargo, es probable que los mecanismos de enfriamiento transpiracional y la regulación del intercambio de agua hayan ayudado a prevenir un daño más severo al PSII en papaya silvestre. Estos mecanismos podrían ayudar a mantener la homeostasis térmica y a proteger la eficiencia fotosintética durante periodos cortos de estrés térmico (Zhu *et al.*, 2021).

El estado hídrico de las hojas, medido como potencial hídrico (Ψ), no mostró diferencias significativas entre los genotipos bajo condiciones control. Sin embargo, después de 2 horas a 50°C, el genotipo Maradol mostró un potencial hídrico menor (-1.22 MPa) en comparación con el genotipo silvestre (-0.80 MPa) (Tabla 2).

El potencial hídrico (Ψ) es una medida que indica el nivel de hidratación y la disponibilidad de agua en las plantas. Cuando el potencial hídrico disminuye, significa que existe menos agua disponible o una mayor dificultad para que el agua se mueva a través de los tejidos de la planta. Según lo observado, el genotipo Maradol experimentó una mayor disminución en su potencial hídrico después de ser expuesto a una temperatura de 50°C, en comparación con el genotipo silvestre. Esto sugiere que el genotipo silvestre tiene mayor capacidad de mantener la temperatura de sus hojas y un potencial hídrico estable, siempre y cuando el suelo esté bien regado y no exista limitación de agua.

Por otra parte, la estabilidad e integridad de la membrana celular se evaluó mediante la pérdida de electrolitos. El análisis de datos ($p < 0.05$) mostró que no hubo diferencias entre genotipos a temperatura de invernadero y en la cámara térmica, con medias superiores a 16.95 para Maradol y 15.05 para el genotipo silvestre. Después del tratamiento de estrés a 50°C, se observó un aumento significativo en el porcentaje de fuga de electrolitos en el genotipo Maradol (44.43%), en comparación con el genotipo silvestre (29.85%). Después del período de recuperación, ambos genotipos redujeron la pérdida de electrolitos en las hojas (Figura 3).

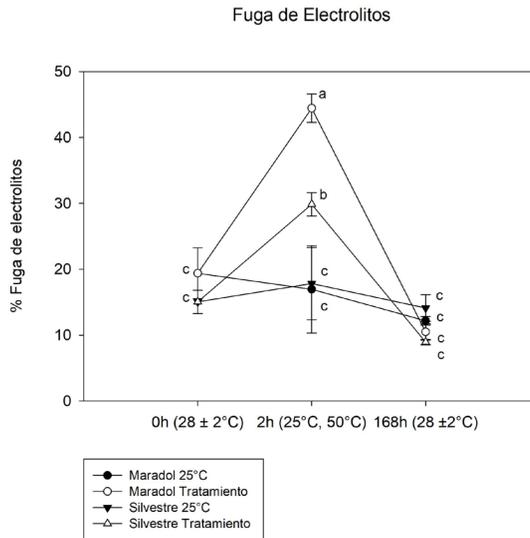


Figura 3. Pérdida de electrolitos (%) en plantas de *C. papaya* Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos

Varios estudios (Demidchik *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Wassie *et al.*, 2019) relacionan la pérdida de electrolitos, incluida la salida de iones K^+ y otros aniones como un sello distintivo de la respuesta de estrés por alta temperatura en plantas. Aquellas especies que presentaron una menor pérdida de electrolitos bajo estrés térmico generalmente indican una mayor tolerancia al estrés y la capacidad de mantener la integridad de la membrana celular y, en consecuencia, pueden mantener un rendimiento fotosintético más eficiente (Wassie *et al.*, 2019).

Por otro lado, el análisis del contenido de prolina mostró que, en condiciones control (invernadero y caja térmica) y su respectiva recuperación, no existieron diferencias entre los genotipos. Sin embargo, después del tratamiento de 50°C , ambos genotipos acumularon prolina durante el estrés, siendo de 26.11 mg g^{-1} para Maradol y 25.11 mg

g^{-1} para el genotipo silvestre. Después del periodo de recuperación, los valores se mantienen con medias de 23.25 mg g^{-1} para Maradol y 22.60 mg g^{-1} para el genotipo silvestre, a diferencia de sus controles (Figura 4).

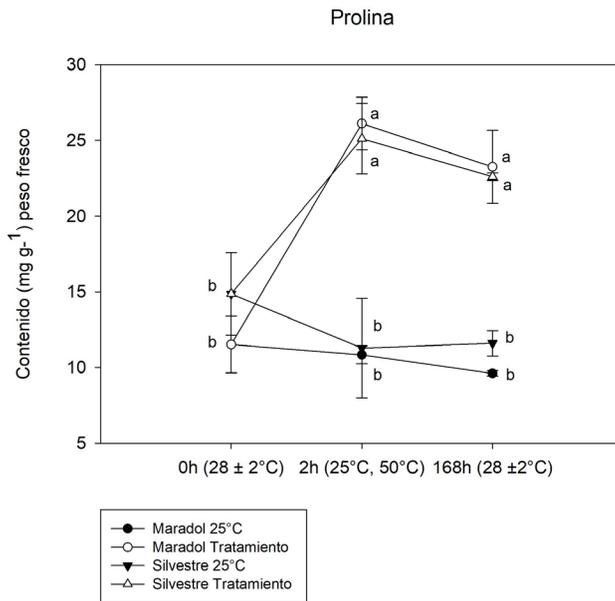


Figura 4. Contenido relativo de prolina (mg g^{-1} peso fresco) en plantas de *C. papaya* Maradol y silvestre ante estrés por alta temperatura a tiempo 0 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), tiempo de exposición 2h (25°C y 50°C) y tiempo de recuperación 168h ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Las barras en los puntos corresponden a la media \pm la desviación estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre la media de los tratamientos

Uno de los efectos beneficiosos de la acumulación de prolina es su capacidad para actuar como un antioxidante no enzimático (Rivero *et al.*, 2014). Su acumulación ha sido reportada por varios autores (Rivero *et al.*, 2014; Tonhati *et al.*, 2020; Kishor *et al.*, 2022). Los resultados del estudio indican que la acumulación de prolina en los genotipos analizados puede tener un papel importante en la protección y estabilización de las células durante el estrés por alta temperatura. La prolina actúa

como un osmolito, protege la estructura de las proteínas, actúa como antioxidante no enzimático y su acumulación en el citoplasma celular no interfiere con el metabolismo celular (Kishor *et al.*, 2022). Estos hallazgos contribuyen a comprender mejor los mecanismos de respuesta al estrés en las plantas y podrían tener implicaciones en la mejora de la tolerancia de los cultivos a condiciones ambientales adversas.

Conclusiones

Los resultados sugieren que el genotipo Maradol, al ser expuesto a un estrés térmico, muestra una mayor disminución en su actividad fotosintética y una menor capacidad de recuperación en comparación con el genotipo silvestre. Además, el genotipo silvestre exhibe una mayor tolerancia al estrés térmico, posiblemente debido a su capacidad de enfriamiento de las hojas. Estos resultados resaltan la importancia de considerar y aprovechar las características benéficas del genotipo silvestre en futuros programas encaminados a mejorar la tolerancia a altas temperaturas en las actuales variedades comerciales susceptibles, como es la variedad Maradol.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada, con número de CVU: 1150026 y al proyecto CONAHCYT, Ciencias de Frontera 320373. Al maestro Robert Us (CICY) por su apoyo y conocimiento en el manejo de los equipos utilizados. A la Dra. Fuentes por compartir su experiencia en el diseño experimental y en la lectura crítica del manuscrito.

Referencias

Bheemanahalli, R., Vennam, R. R., Ramamoorthy, P., & Reddy, K. R. (2022). Effects of post-flowering heat and drought stresses on physiology, yield, and quality in maize (*Zea mays* L.). *Plant Stress*, 6(100106), 100106. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100106>

- Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin, V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, *65*(5), 1259–1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
- dos Santos, T. B., Ribas, A. F., de Souza, S. G. H., Budzinski, I. G. F., & Domingues, D. S. (2022). Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: A review. *Stresses*, *2*(1), 113–135. <https://doi.org/10.3390/stresses2010009>
- Jedmowski, C., & Brüggemann, W. (2015). Imaging of fast chlorophyll fluorescence induction curve (OJIP) parameters, applied in a screening study with wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes under heat stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, *151*, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.020>
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., Łukasik, I., Goltsev, V., & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(4). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>
- Kumar, D., Singh, H., Raj, S., & Soni, V. (2020). Chlorophyll a fluorescence kinetics of mung bean (*Vigna radiata* L.) grown under artificial continuous light. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *24*(100813), 100813. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100813>
- Mathur, S., Jajoo, A., Mehta, P., & Bharti, S. (2011). Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*): Elevated temperature-induced changes in PSII of wheat. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, *13*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00319.x>
- Nankishore, A., & Farrell, A. D. (2016). The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal*

- of *Plant Physiology*, 202, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.006>
- Núñez-Muñoz, L., Calderón-Pérez, B., Ruiz-Medrano, R., & Xocostle-Cázares, B. (2022). Gene editing to improve drought tolerance. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*, 2022. <https://doi.org/10.1079/cabreviews202217048>
- Oukarroum, A., El Gharous, M., Goltsev, V., & Strasser, R. J. (2016). Delayed fluorescence emission as a probe for the response of photosynthetic organisms to high temperature exposure: A comparative study. *Journal of Luminescence*, 180, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.08.061>
- Oukarroum, A., Goltsev, V., & Strasser, R. J. (2013). Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection. *PLoS One*, 8(3), e59433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059433>
- Urban, J., Ingwers, M., McGuire, M. A., & Teskey, R. O. (2017). Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signaling & Behavior*, 12(8), e1356534. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356534>
- Wang, P., Zhao, L., Hou, H., Zhang, H., Huang, Y., Wang, Y., Li, H., Gao, F., Yan, S., & Li, L. (2015). Epigenetic changes are associated with programmed cell death induced by heat stress in seedling leaves of *Zea mays*. *Plant & Cell Physiology*, 56(5), 965–976. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv023>
- Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., & Chen, L. (2019). Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 9(10), 597. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100597>
- Yadav, S., Modi, P., Dave, A., Vijapura, A., Patel, D., & Patel, M. (2020). *Effect of abiotic stress on crops*. En Sustainable Crop Production. IntechOpen.

- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: Physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117. <https://doi.org/10.3390/ijms22010117>
- Zhu, L., Wen, W., Thorpe, M. R., Hocart, C. H., & Song, X. (2021). Combining heat stress with pre-existing drought exacerbated the effects on chlorophyll fluorescence rise kinetics in four contrasting plant species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10682. <https://doi.org/10.3390/ijms221910682>

Biotecnología **modelo de negocios y aspectos socioeconómicos**



INTRODUCCIÓN

La Biotecnología está indisolublemente ligada a la sociedad en un amplio sentido. Es una ciencia y una tecnología que tiene implicaciones disruptivas ya que es capaz de transformar patrones científicos, tecnológicos y económicos. Lo que al mismo tiempo genera preocupaciones sobre los posibles efectos que puede tener en el medio ambiente, la salud o en los cultivos, por mencionar solo algunos. Es por ello que es fundamental discutir con base en evidencia científica sobre las condiciones, actividades y procesos que requieren ser regulados bajo los principios de salvaguardar la salud y el equilibrio medio ambiental, pero considerando la complejidad socioeconómica que representa su desarrollo, introducción y uso por la amplia diversidad de grupos productivos y sociales.

Los principios de bioética y bioseguridad plantean retos muy profundos para todos los involucrados con la Biotecnología. No obstante, es una obligación de todas y todos los involucrados tenerlos presentes, para así potencializar los beneficios y mitigar los efectos negativos que pueden ser muy diversos, ya que los desarrollos tecnológicos siempre están inmersos en un ambiente incierto, donde en ocasiones es difícil visualizar todos los posibles resultados. Por lo tanto, son muchos y muy diversos los desafíos que plantea del desarrollo biotecnológico y se demanda de la convergencia interdisciplinaria para poder hacer frente y dirimir los conflictos, controversias y debates que se abren ante el avance científico y tecnológico.

El presente apartado contribuye con un trabajo que plantea la responsabilidad social de la biotecnología agrícola en el marco de la convergencia tecnológica. Capítulo que busca introducir a sus lectores en la relación ciencia-tecnología y sociedad.

LA RESPONSABILIDAD SOCIAL DE LA BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA EN EL MARCO DE LA CONVERGENCIA TECNOLÓGICA

Mónica Anzaldo Montoya^{1*} y Michelle Chauvet²

RESUMEN

El objetivo de este estudio es reflexionar sobre los alcances y limitaciones del enfoque de la responsabilidad social de la investigación e innovación (RSII) de la biotecnología agrícola, en un contexto de convergencia tecnológica en el que se entrecruzan una diversidad de actores privados, públicos y sociales. A partir de una revisión de la literatura científica sobre RSII, identificamos, analizamos y comparamos los trabajos más recientes sobre la aplicación del enfoque en proyectos de investigación e innovación en el sector agroalimentario en el marco de diferentes tecnologías. De esta manera, ofrecemos una síntesis de los hallazgos de esta literatura en términos de las estrategias y retos que existen para la implementación de la RSII, y emitimos algunas recomendaciones para avanzar en su implementación en México.

PALABRAS CLAVE

Responsabilidad social, biotecnología agrícola e inclusión social, convergencia tecnológica, innovación responsable.

¹ CONAHCYT-El Colegio de San Luis, San Luis Potosí, México, Parque de Macul #155, Fracc. Colinas del Parque, San Luis Potosí, S.L.P., Mx., C.P. 78294, México.

* monica.anzaldo@colsan.edu.mx

² Universidad Autónoma Metropolitana - Azcapotzalco

Introducción

Desde la primera reunión en Asilomar (1975)¹ ha sido una preocupación de la comunidad científica la evaluación de riesgo y regulación de la biotecnología; sin embargo, las consideraciones socioeconómicas han tenido una menor atención, lo que lleva a que no sea una evaluación integral. De ahí el interés por profundizar en ese problema bajo el concepto de responsabilidad social de la investigación y la innovación (RSII). A partir de las aportaciones de Jonas (1995) y de Stilgoe *et al.* (2013), el concepto de responsabilidad social se entiende como el compromiso de aquellos actores sociales implicados en el diseño, desarrollo, utilización y regulación de las tecnologías, así como deliberar sobre las dimensiones sociales, éticas y ambientales de sus decisiones, sobre todo las relacionadas con las etapas tempranas del desarrollo tecnológico, a fin de anticipar o, en su caso, mitigar las consecuencias no deseadas de sus elecciones tecnológicas.

La Declaración de Roma de la UE (2014) resumió responsabilidad social como el proceso de alinear la investigación y la innovación con los valores, necesidades y expectativas de la sociedad (Carsten *et al.*, 2023). Para el desarrollo sólido de la biotecnología en América Latina consideramos imprescindible construir un enfoque de RSII por parte de los académicos y profesionales en esta línea, así como brindar elementos para la capacitación de futuras generaciones de biotecnólogos.

Este enfoque aplicado a la biotecnología agrícola presenta ciertos límites para ser apropiado para la evaluación de riesgo, si lo enmarcamos dentro de la convergencia tecnológica que se configura en el concurso de la digitalización, la nanotecnología, la robótica, el internet de las cosas (IoT) y la inteligencia artificial, entre otras tecnologías.

La implementación de la RSII es compleja a la luz de las muy diferentes preguntas de investigación, métodos y posibles resultados en todas las disciplinas e instituciones, ahora que la biotecnología está enmarcada en la convergencia tecnológica, por ello consideramos que se deben dedicar esfuerzos en esta línea.

¹ La conferencia sobre el ADN recombinante realizada en Asilomar State Beach fue para discutir sobre los posibles riesgos de esta innovación y acordar una regulación de la misma ante la moratoria voluntaria que los científicos habían acordado.

El objetivo del trabajo es reflexionar sobre los alcances y limitaciones de la RSII de la biotecnología agrícola, en un contexto de convergencia en el que necesariamente se intercala con otras tecnologías complejas e interactúa con una diversidad de actores privados, públicos y sociales. A partir de una revisión de la literatura científica sobre RSII, identificamos, analizamos y comparamos los trabajos más recientes sobre la aplicación del enfoque en proyectos de investigación e innovación en el sector agroalimentario en el marco de diferentes tecnologías. De esta manera, ofrecemos una síntesis de los hallazgos de esta literatura en términos de las estrategias y retos que existen para la implementación de la RSII. El capítulo comienza con una visión general conceptual de la RSII, para dar paso a los ejemplos de aplicación de esta perspectiva a diversos casos, finaliza con una serie de recomendaciones en este campo.

Métodología

Se realizó un estudio de *benchmarking* o estudio comparativo de casos de aplicación de los principios y valores de la RSII a casos reales de evaluación de nuevas tecnologías. Esta metodología es ampliamente utilizada para comparar el desempeño de políticas y experiencias respecto a los líderes en la materia, a fin de generar indicadores o recomendaciones para alcanzar las mejores prácticas de desempeño (UNCTAD, 2017). Para identificar los casos realizamos una búsqueda de artículos en la base de datos SCOPUS utilizando los términos *responsible innovation*, *responsible research*, *agriculture* y *food*. La búsqueda inicial arrojó 185 documentos. Después de la depuración, se obtuvieron 177 trabajos, de los cuales se seleccionaron 40 que cumplían los criterios para realizar el presente estudio.

El marco analítico de la innovación responsable

La *Investigación e Innovación Responsables* (IIR) se centra en los retos que plantea la investigación científica y el desarrollo tecnológico desde su diseño mismo, con el fin de anticipar sus implicaciones y desarrollar

una capacidad de respuesta para mitigar los daños socio-éticos y atender las preocupaciones de la sociedad (Stilgoe, 2013; Bronson, 2019). Como lo indican Stilgoe, Owen y Macnaghten: "...cuidar el futuro a través de la administración colectiva de la ciencia y la innovación en el presente" (2015: 1570). Dimensiones de la innovación responsable según Stilgoe, Owen y Macnaghten, 2015:

1. Anticipación: identificar con antelación las repercusiones más relevantes y forjar una investigación de riesgos socialmente sólida. Se busca identificar futuros sociotécnicos clave posibles y plausibles que pueden desarrollarse como resultado de su trabajo (Carsten *et al.*, 2023).

2. Reflexividad: analizar con detenimiento. Se revisan los por qué, para qué, para quién de las innovaciones, y se reconoce que el enfoque de un aspecto no necesariamente es válido para todas las circunstancias. Evaluación de los valores personales, interpersonales y contextuales (sociales) que son relevantes para los escenarios que se han identificado, arriba.

3. Inclusión: integrar nuevos actores en la gobernanza de la ciencia, pero no para la simulación que lleve a la legitimización.

4. Capacidad de respuesta: qué tanto se pueden adaptar las instituciones y los sistemas de innovación para que sean lo más receptivos posible. Perfilar qué se tiene que hacer en el presente para lograr la RSII.

Aunque supone un gran reto, es fundamental alinear la investigación y la innovación de la biotecnología con las necesidades y expectativas de la sociedad, en el marco de la convergencia tecnológica ya descrita. Donde el ensamble de estas tecnologías le imprime un grado mayor de dificultad, dada la diversidad de actores y la incertidumbre que generan algunas de ellas.

Estas innovaciones están profundizando la exclusión de productores y otros actores sociales. Por ejemplo, la maquinaria agrícola automatizada y la digitalización de ciertos procesos agrícolas que genera una infinidad de datos de campo (Lavarello, *et al.*, 2019) ha dejado fuera de la actividad a ingenieros agrónomos y ha dado paso a otras profesiones como los nuevos actores, nos referimos a ingenieros informáticos, programadores y mercadólogos, entre otros.

Resultados y discusión

Los desarrollos de la biotecnología agrícola no han alcanzado la meta de resolver el problema alimentario, como se ha sostenido por años que se haría. La razón de fondo es que no se trata de un problema técnico, sino económico-político. Además, se ha enfocado en atender los problemas agronómicos de los productores de los países desarrollados para los cultivos comerciales de mayor demanda: maíz y soya, base de la alimentación animal para la producción de proteína que los consumidores pobres de los diversos países no pueden costear (Chauvet, 2015).

Con la convergencia tecnológica la evaluación de riesgo y la regulación son más complejas. Las grandes compañías digitales se apropian de los datos que les arrojan las aplicaciones que ofrecen de manera gratuita a los agricultores y ellas obtienen ventajas en los mercados a futuro. Esa información también les permite redireccionar financiamientos, promover productos y hasta plantear políticas que les beneficien o, por el contrario, frenar desarrollos de la biotecnología agrícola que no convengan a sus intereses.

No obstante, el estudio comparativo de casos reales hizo evidente las dificultades que se presentan para realizar innovaciones de acuerdo con las dimensiones de la innovación responsable, tales como: barreras materiales y financiamiento, baja disposición a erradicar prácticas existentes, ambigüedad en la delimitación de responsabilidades, incertidumbre en la regulación a largo plazo y la confrontación de intereses divergentes o incluso contradictorios, como se puede desprender en la Tabla 1.

Tabla 1. Estrategias, barreras y retos para la RSH

Dimensiones de la Innovación Responsable (Stilgoe, 2013)	Estrategias para la implementación de la Innovación Responsable	Barreras a la implementación	Retos para la implementación en países del Sur Global
<i>Anticipación</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Foresigth (técnicas de anticipación y prospectiva) • Escenarios • Evaluación de tecnología • Evaluación de riesgos • Evaluación del ciclo de vida • Evaluación de la visión • Establecer los pilares de la IR en los criterios de apoyo a la investigación. 	<ul style="list-style-type: none"> • La IR requiere inversión de recursos (e.g. programa Digscape 30 millones de dólares australianos). • Se considera un enfoque con conceptos muy normativos. • Pone en tensión las lógicas organizacionales dominantes • Preocupación por la idea de responsabilizarse de los efectos de la tecnología en el marco del sector público. • Las empresas requieren controles e incentivos para la implementación de actividades de IR. • Pocas empresas tienen la capacidad para realizar pruebas de seguridad que los reguladores imponen. 	<ul style="list-style-type: none"> • La anticipación de los efectos de la tecnología es ya un proceso complejo que se dificulta aún más cuando se trata de integrar en contextos pluriculturales, por ello, es conveniente comprender la tecnología como 'formas de vida' (Winner, 1989), con potencial de configurar modos de habitar el mundo, y no solo como herramientas con efectos secundarios para la salud y ambiente (Ludwig y Macnaghen, 2020). • Las comunidades tradicionales tienden a imaginar futuros que difieren mucho de los imaginarios de los actores de gobernanza externos (Ludwig y Macnaghen, 2020). • Escaso conocimiento sobre IR, lo que dificulta su implementación en el sector público o privado.
<i>Reflexividad</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Colaboración multidisciplinaria y capacitación en IR • Consultar al usuario final en etapas tempranas y sistemáticamente. • Integrar a investigadores de las ciencias sociales, ética y de estudios CTS en los laboratorios. • Implementar Códigos de conducta • Grupos de enfoque • Innovación abierta • Colaboración multidisciplinaria y formación • Incluir Científicos sociales y especialistas en ética integrados en laboratorios • Evaluación ética de la tecnología 	<ul style="list-style-type: none"> • Se dificulta porque la tecnología suele avanzar demasiado rápido como para articular significativamente las trayectorias de desarrollo. • Se dificulta cuando los objetivos de los proyectos son comerciales en lugar de bien público. • Se limita cuando las aplicaciones prometidas con un mercado son muy específicas. • Una barrera importante es que los reguladores abordan ciertas aplicaciones desde una perspectiva de 'no hacer daño' en lugar de preguntarse '¿realmente necesitamos esto?' 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere ampliarse en la comprensión de otros sistemas de conocimiento, valores, ontologías, visiones de mundo (Ludwig y Macnaghen, 2020).

- Gobierno: Implementar políticas específicas para la tecnología en cuestión.
 - Establecer Training public communication officers e Issues Management Team para involucrar actores.
 - Garantizar apertura y pluralidad en el involucramiento de actores.
 - Impulsar grupos de diálogo y consulta con los actores interesados en primeras etapas del proceso de I+D y en las siguientes.
- IES y empresas**
- Diseño centrado en el usuario (consumidor/necesidades sociales)
 - Inclusión de no expertos en comités asesores científicos (activistas, consumidores, ONG, sindicatos, tomadores de decisión, reguladores).
- Herramientas**
- Foros de ciudadanos, grupos focales, conferencias de consenso, mapeo de necesidades y asambleas de ciudadanos.
 - Crear de programas de investigación temáticos y de grandes desafíos.
 - Regulaciones y normas técnicas.
 - Acceso abierto y otros mecanismos de transparencia.
 - Gestión de nichos
 - Diseño orientado al valor
 - Moratorias
 - Puertas de escenario
 - Códigos de conducta
 - Estrategias de gestión (stage gates)
- La propiedad intelectual es una barrera debido a que las empresas prefieren no hablar de sus planes de innovación con actores externos.
 - Los científicos impulsan la innovación para resolver problemas prácticos que no siempre son bien entendidos o claros para el público.
 - Los científicos están de acuerdo con ampliar la transparencia de los procesos de innovación, pero no que ésta sea guiada por la opinión del público o un grupo minoritario.
 - Prevalece, aunque en mejor medida, la idea de que los actores involucrados en el desarrollo de innovaciones deben ser los expertos.
 - Prevalece la idea de que la participación se centre en aumentar la educación al pública en lugar de la inclusión (modelo del déficit).
- Requiere implementarse con la inclusión efectiva de actores locales (Ludwig y Macnaghten, 2020) como pueblos originarios, poblaciones vulnerabilizadas y excluidas.
 - La IR surge en respuesta a necesidades de gobernanza tecnológica del Norte Global, por lo que carece de recursos analíticos para enfrentar los problemas de la innovación del Sur Global, articulados negativamente con luchas por la autodeterminación, la colonialidad y la injusticia epistémica.
 - La IR se institucionaliza en procesos de gobernanza de arriba hacia abajo (gobiernos, organismos de financiación, organismos internacionales). Esta situación limita la representación de la población indígena y otros actores locales (Ludwig y Macnaghten, 2020).
- Puede verse limitada por normatividades estrictas de quienes financian recursos o reglas de financiamiento inflexibles.
 - Los investigadores pueden ser conscientes y estar dispuestos a hacer cambios, pero les resulta difícil responder.
 - Ampliar el conocimiento de la IR no solo para fomentar procesos inclusivos, sino para garantizar que los involucrados en esos procesos tengan suficiente confianza en que la inclusión realmente conducirá a mejores resultados.

Capacidad de respuesta (Responsiveness (sensibilidad))

Otras

Justicia epistémica y Justicia Social

-
- Desarrollar mecanismos para atender la **soberanía de datos de poblaciones indígenas** en contextos poscoloniales.
 - Asignar recursos de investigación específicos para investigadores de pueblos originarios.
- Enfoque limitado para analizar cuestiones de poder entre los promotores de una tecnología y los actores interesados o afectados. El enfoque de IR podría expandir su utilidad en contextos pluriculturales incorporando otras dimensiones como la justicia social (distribución, reconocimiento y representación) (Ludwig & Macnaghten, 2020).

De los diversos casos expuestos en la Tabla 1 se desprende que el desafío es interdisciplinario y lleva a involucrar a biotecnólogos, estudiantes de informática, ingeniería, derecho, ciencias sociales, periodismo, artes, negocios, administración e incluso a voces externas al diseño del proyecto; de lograrse, esto ayudaría a desarrollar las mejores prácticas de RI (Carsten *et al.*, 2023).

El ejercicio de una RSII requiere de mecanismos que permitan la participación social informada, porque no son los académicos quienes debieran establecer qué es lo socialmente aceptable. De obviar este aspecto se concretiza lo afirmado por Carlota Pérez: “En cualquier punto del tiempo los espacios de lo científicamente concebible y lo tecnológicamente posible son mucho más amplios que los espacios de lo económicamente viable o lo socialmente aceptable” (2004: 660).

Algunas fuentes de financiamiento, sobre todo en el Reino Unido, exigen que la responsabilidad en la investigación y la innovación se incluyan en el perfil de la formación de recursos humanos, así como en la estructura de los centros de investigación (Carsten *et al.*, 2023), con lo cual no sería extraño que este requisito se extendiera a las agencias que otorgan recursos para el desarrollo de proyectos.

Otra recomendación para tomar en cuenta es el desarrollo de programas de capacitación en RSII en los distintos planes de estudio de las carreras de biotecnología y de aquellas que convergen con esta. La RSII es un proceso continuo a lo largo del ciclo de vida de un proyecto de investigación, y la evaluación debe incluir este proceso. Parte del valor de la responsabilidad social radica en alentar y permitir a los investigadores considerar su trabajo desde un punto de vista social más amplio y ayudar a los profesionales a ofrecer altos estándares acordes con los deseos y necesidades de la sociedad (Carsten *et al.*, 2023).

Conclusiones

Las cuatro dimensiones de la responsabilidad social son un camino para pasar de la exclusión a la inclusión social, pero está por construirse. En cuanto a la regulación, se deben establecer responsabilidades

diferenciadas porque no se tiene el mismo poder entre los diversos actores que desarrollan la biotecnología.

La participación de diversos sectores de la sociedad debidamente informados garantiza una evaluación de riesgo integral. Para el ejercicio de la responsabilidad social de la innovación, un aspecto en el que se ha puesto énfasis es en la inclusión de diversos actores con formaciones disciplinares diferentes que tomen en cuenta a las ciencias sociales, a los biotecnólogos, los desarrolladores de tecnología, los reguladores hasta los posibles beneficiarios o afectados de estas nuevas tecnologías, de esta manera la evaluación de riesgo sería socialmente más sólida.

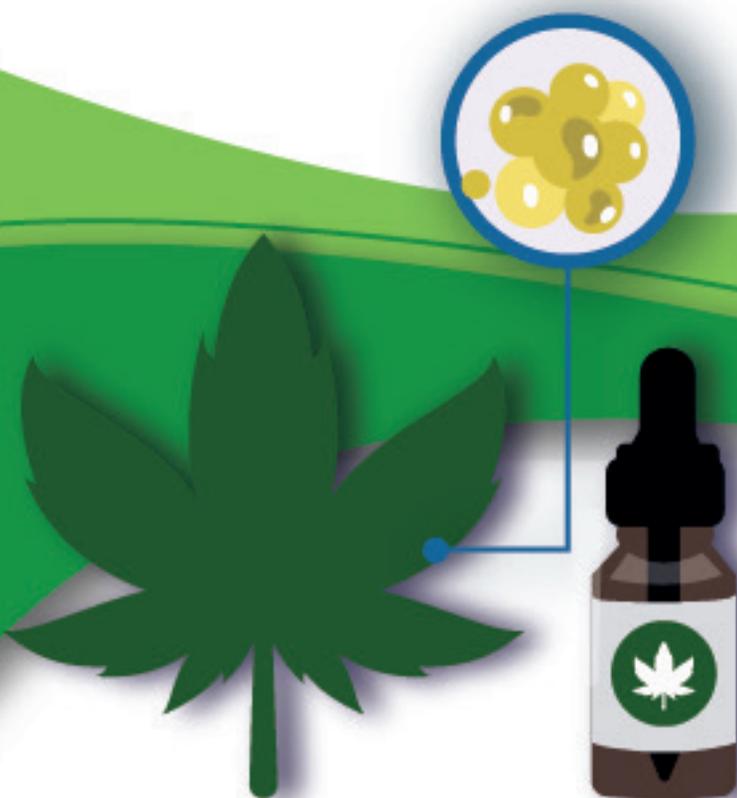
El tener una perspectiva de RSII dará paso a alertar sobre los riesgos asociados a las innovaciones y cómo minimizarlo. Asimismo, la actualización de la información sería un aporte a la sociedad dado el dinamismo de la convergencia tecnológica y la importancia de proporcionar información certera. Finalmente, el establecer la capacitación en RSII para biotecnólogos y en la formación de recursos humanos llevará a nuevos horizontes.

Referencias

- Bronson, K. (2019). Looking through a responsible innovation lens at uneven engagements with digital farming. *NJAS: Wageningen Journal of Life Sciences*, 90-91(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2019.03.001>
- Chauvet, M. (2015). *Biotecnología y sociedad*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Jonas, H. (2014). *El principio de responsabilidad: Ensayo de una ética para la civilización tecnológica*. Herder. <https://doi.org/10.2307/j.ctvt9k2sz>
- Lavarello, P., Bil, D., Vidoso, R., Langard, F. (2019). Reconfiguración del oligopolio mundial y cambio tecnológico frente a la agricultura 4.0: implicancias para la trayectoria de la maquinaria agrícola en Argentina. *Ciclos*, 30(53), 163-193.
- Ludwig, D., & Macnaghten, P. (2020). Traditional ecological knowledge in innovation governance: A framework for responsible

- and just innovation. *Journal of Responsible Innovation*, 7(1), 26-44. <https://doi.org/10.1080/23299460.2019.1676686>
- Pérez, C. (2004). *Revoluciones tecnológicas y capital financiero*. Siglo XXI.
- Stahl, B. C., Aicardi, C., Brooks, L., Craigon, P. J., Cunden, M., Burton, S. D., Heaver, M. D., Saille, S. D., Dolby, S., Dowthwaite, L., Eke, D., Hughes, S., Keene, P., Kuh, V., Portillo, V., Shanley, D., Smallman, M., Smith, M., Stilgoe, J., ... Webb, H. (2023). Assessing responsible innovation training. *Journal of Responsible Technology*, 100063. <https://doi.org/10.1016/j.jrt.2023.100063>
- United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD) (2017). *Módulo 2 formulación y evaluación de políticas de CTI*. Manual del participante.
- Stilgoe, J., Owen, R., & Macnaghten, P. (2013). Developing a framework for responsible innovation. *Research Policy*, 42(9), 1568-1580. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2013.05.008>
- Stilgoe, J., Owen, & Macnaghten, P. (2015). Developing a framework for responsible innovation. *Research Policy* 42, 1568 – 1580.
- Winner, L. (1987). *La ballena y el reactor: una búsqueda de los límites en la era de la alta tecnología*. Gedisa Editorial.

Cannabis



INTRODUCCIÓN

Este capítulo describe el uso de una tecnología de vanguardia como la homogenización a ultra alta presión (UHPH) para el desarrollo de productos a nivel de nanoemulsiones de compuestos bioactivos como son los fitocompuestos extraídos del Cannabis. Los fitocannabinoides son de gran interés actual para la producción de fármacos que pueden ser administrados por diferentes vías con el fin de contrarrestar los síntomas de enfermedades como la epilepsia, cáncer, glaucoma, diabetes, obesidad, migraña o problemas mentales como la depresión y ansiedad por mencionar algunos ejemplos.

La vía de administración más habitual para el CBD (Cannabidiol, fitocanabinoide de mayor importancia en medicina) es la oral por su rápida absorción; sin embargo, presenta limitaciones debido a la baja biodisponibilidad de los aceites de CBD comerciales. Una manera de reducir esta problemática es creando nanoemulsiones, un proceso conocido para mejorar la liberación de compuestos bioactivos lipofílicos haciéndolos más hidrosolubles.

La microfluidización es un método utilizado para la producción de materiales de tamaño micro y nanométrico que se utiliza comúnmente para elaborar emulsiones, mejorando la absorción y evitando la degradación de los compuestos bioactivos durante la elaboración o el almacenamiento del producto. La introducción de nuevos homogeneizadores como la UHPH permite alcanzar presiones de hasta 400 MPa. Estos diseños permiten tener sistemas estables para las diferentes industrias alcanzando reducciones de tamaño hasta los 100 nm aproximadamente, lo que representa una gran ventana para los sistemas de protección de compuestos, así como los de liberación controlada.

Con el uso de la UHPH se demostró que es posible producir nanoemulsiones de aceite de CBD comercial (<100 nm) utilizando el proceso de UHPH a una presión de 200 MPa. Las condiciones

Introducción

del tratamiento y el tipo de emulsificante influyeron en la estabilidad de la nanoemulsión, logrando mejores resultados con la mezcla de aceite CBD y Tween 80.

Jorge Alberto García Fajardo

NANOEMULSIONES DE ACEITE DE CBD COMERCIAL ELABORADAS POR HOMOGENIZACIÓN A ULTRA ALTA PRESIÓN

Daniela Alejandra Robles-Vences¹, Ángela Suárez Jacobo^{2*},
Ma. del Carmen Hernández-Jaimes³, Jesús Carlos Ruiz Suárez⁴ y
Jorge Alberto García Fajardo^{1*}

RESUMEN

Con el paso del tiempo se han buscado alternativas a la medicina convencional para el tratamiento de diversos malestares y enfermedades. Se ha estudiado el uso del cannabidiol (CBD) por sus efectos antiinflamatorios, ansiolíticos y analgésicos, entre otros. La vía de administración más habitual para el CBD es la oral por su rápida absorción; sin embargo, presenta limitaciones debido a la baja biodisponibilidad de los aceites de CBD comerciales. Se ha estudiado la manera de reducir esta problemática creando nanoemulsiones, un proceso conocido para mejorar la liberación de compuestos bioactivos lipofílicos haciéndolos más hidrosolubles. De esta manera, en el presente trabajo de investigación se describe el procesamiento de una nanoemulsión O/W de aceite de CBD comercial usando homogeneización a ultra alta presión (UHPH, por su acrónimo en inglés).

PALABRAS CLAVE

Nanoemulsiones, CBD soluble en agua, Microfluidización, dispersión, alta presión.

¹ CIATEJ Noreste, Autopista Mty-Aeropuerto, Vía de la Innovación 404, Parque PIIT, Apodaca, Nuevo León, México 66628. * asuarez@ciatej.mx, jgarcia@ciatej.mx

² CIATEJ Zapopan, Camino al Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México 45019.

³ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 15.5, Piedras Blancas, Toluca, México, México 50200.

⁴ CINVESTAV-Monterrey, Autopista Mty-Aeropuerto, Vía del Conocimiento 201, Parque PIIT, Apodaca, Nuevo León, México 66628.

Introducción

Cannabis y salud

El Cannabis, miembro de la familia *Cannabaceae*, es uno de los cultivos domesticados más antiguos del mundo que por generaciones se ha utilizado con diversos fines (Hurgobin *et al.*, 2021). Actualmente, se ha visto la necesidad de seguir generando conocimiento debido a su importancia económica y a los subproductos que se pueden obtener a partir de él y sus posibles aplicaciones, en especial por sus propiedades curativas. No obstante, su cultivo, propagación y estudio se han visto detenidos debido a las regulaciones legales que se tienen en diferentes jurisdicciones alrededor del mundo.

La planta cuenta con una morfología ya identificada que consta principalmente de: hojas, tallos, flores, raíces, semillas, polen y tricomas; de cada una de estas partes se pueden extraer diferentes concentraciones de compuestos dependiendo de las condiciones del cultivo y de la variedad de subespecies que se esté tratando (Tabla 1), entre las que destacan *Cannabis sativa*, *indica* y *rudelaris* (Andre *et al.*, 2016). Si el cultivo es tipo fibra, las aplicaciones principales se dirigen al ramo industrial, en el que se pueden aprovechar los resistentes tallos fibrosos conocidos como cáñamo para fines dirigidos a la producción de textiles (Rupasinghe *et al.*, 2020), piensos para ganado o materiales de construcción (Andre *et al.*, 2016; Kleinhenz *et al.*, 2020). Por otro lado, el cultivo de tipo droga permite aprovechar los fitocannabinoides almacenados en los tricomas de las plantas para su uso recreativo o para la producción de fármacos que pueden ser administrados por diferentes vías con el fin de contrarrestar los síntomas de enfermedades como la epilepsia, cáncer, glaucoma, diabetes, obesidad o infertilidad por mencionar algunos ejemplos (Adelli *et al.*, 2017; Hamerle *et al.*, 2014; Sawtelle & Holle, 2021). Dichos malestares pueden ser tratados estimulando la actividad del sistema endocannabinoide humano que cuenta con receptores CB y CB2 distribuidos en el sistema nervioso central y el sistema inmune, respectivamente, estos receptores acoplados a proteína G permiten

su interacción con los principales fitocannabinoides de Cannabis: CBD y THC (Behl *et al.*, 2021).

Tabla 1. Concentraciones de los cannabinoides en diferentes partes de la anatomía de *Cannabis* tipo droga

Parte de la planta	THC	CBD
Fascículos de la raíz	1.04	1.67
Semilla	36-174	4.2-78
Tallo	3000	----
Hojas	22000	3000
Polen	31230	440
Flor	95100	10900

Los datos se expresan en $\mu\text{g/g}$ de peso seco. Abreviaturas: THC (Δ^9 – tetrahidrocannabinol); CBD (cannabidiol). Adaptado de Andre *et al.*, (2021).

El THC es el mayor psicoactivo de Cannabis y el más abundante en las plantas tipo droga, induce sensaciones de euforia, ansiedad, paranoia y déficit cognitivo; sin embargo, sus beneficios medicinales ayudan a aliviar las náuseas provocadas por ciertos tratamientos contra el cáncer y fungir un efecto antiinflamatorio (Sawtelle & Holle, 2021). El CBD, por su parte, es un isómero del THC y predomina en las plantas con mayor cantidad de fibra, tiene efectos analgésicos, neuro protectores, y propiedades que alivian los malestares de personas con cáncer y diabetes. Se ha reportado que la vía de administración más habitual para el CBD es la sublingual por su rápida absorción; no obstante, presenta limitaciones debido a la baja biodisponibilidad de los aceites de CBD comerciales. Se ha estudiado la manera de reducir esta problemática creando nanoemulsiones, un proceso conocido para mejorar la liberación de compuestos bioactivos lipofílicos haciéndolos más hidrosolubles (Leibtag & Peshkovsky, 2020; Rasera *et al.*, 2021).

Importancia de las nanoemulsiones

A partir del año 2000, el uso de nanoemulsiones despertó un gran interés tanto en la comunidad científica como de la industria alimen-

taria debido a que representó una aplicación eficiente y viable para proteger y liberar sustancias activas (Sadurní *et al.*, 2005; Taha *et al.*, 2004) Estas sustancias, en su mayoría, actúan en la prevención de ciertas enfermedades crónicas, de carácter degenerativo, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, entre otras. Otras aplicaciones las encontramos en la industria farmacéutica en sistemas de liberación controlada (Ozogul *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023) en formulaciones cosméticas (Marzuki *et al.*, 2019) y de cuidado personal (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004), en agroquímicos (plaguicidas)(Lee & Tadros, 1982), y en la industria química como medio de reacciones poliméricas (Liu *et al.*, 2004).

Es importante aclarar que las aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria son relativamente recientes. Si bien la nanotecnología se encuentra actualmente implementada en la industria farmacéutica y cosmética mundial, su aplicación al dominio alimentario ha sido más lenta. En este caso, se ha encontrado un beneficio y uso potencial de las nanoemulsiones debido a su capacidad de transportar compuestos bioactivos, atravesar barreras mucosas, son estables a la sedimentación (minimizando la floculación y coalescencia de partículas), mejoran la absorción y la biodisponibilidad, así como evitan la degradación de los compuestos bioactivos durante la elaboración o el almacenamiento del producto.

Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales termodinámicamente inestables de al menos dos líquidos inmiscibles, donde uno de ellos es dispersado en pequeñas gotas esféricas, de diámetros de entre 20 a 200 nm, en otro líquido (McClements, 2012; McClements & Jafari, 2018).

Actualmente, las nanoemulsiones están siendo investigadas debido a la importancia que tiene su formulación, dependiendo de esta, se puede mejorar la efectividad y disponibilidad de un compuesto bioactivo cuando son usadas como vehículo de liberación y adicionalmente mejoran la solubilidad de un compuesto activo de baja solubilidad (Ozogul *et al.*, 2022; Tan & McClements, 2021). En las nanoemulsiones es importante considerar que su estabilidad depende de sus parámetros de formulación (de la fase dispersa, de la cantidad

y estado de las moléculas que ejercen como emulsificantes, tipo y condiciones de tratamiento al que son sometidos), que resultará en una distribución de tamaño de gota óptimo para la matriz alimentaria a la cual se desea añadir.

Las emulsiones como las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero cinéticamente estables, que no pueden formarse espontáneamente, por tanto, es necesaria la aplicación de energía externa para su formación. Esta energía puede ser suministrada por métodos de dispersión (fuerza de cizalla) o por métodos fisicoquímicos (de condensación o baja energía). En la literatura se reportan varios métodos para la obtención de nanoemulsiones (Donsì *et al.*, 2011; McClements, 2012).

Para ser termodinámicamente estables, estos sistemas necesitan la presencia de un surfactante (o emulgente) para disminuir la tensión interfacial en la interfase aceite en agua (O/W). Las moléculas tensoactivas pueden ser macromoléculas, como polisacáridos o proteínas, así como muchas otras moléculas de menor peso molecular que se añaden a alimentos o cosméticos como fosfolípidos, mono/diglicéridos, polisorbatos y ésteres de sorbitan (Tween®, Span®), etc.

En la producción de emulsiones muy finas formadas se requieren altas densidades energéticas, aplicándose fuerzas externas a las mezclas agua-aceite-tensoactivo para deformar, romper grandes gotas para reducirlas de tamaño. Entre los equipos de dispersión más eficaces para producir nanoemulsiones están los homogeneizadores de alta presión, molinos coloidales y los generadores de ultrasonido.

Homogeneizadores a ultra alta presión

La homogeneización a alta presión (HPH, por su acrónimo en inglés) constituye una alternativa para un manejo en continuo de sistemas líquidos aplicando presiones de hasta 150 MPa con la finalidad de estabilizar los sistemas formulados. La introducción de nuevos homogeneizadores a ultra-alta presión (UHPH, por su acrónimo en inglés) permite alcanzar presiones de hasta 400 MPa, donde además es posible el uso de ciclos o pasos. Estos diseños han permitido tener

sistemas estables para las diferentes industrias alcanzando reducciones de tamaño hasta los 100 nm aproximadamente, lo que representa una gran ventana para los sistemas de protección de compuestos, así como los de liberación controlada.

Un homogeneizador consiste en un generador de alta presión tal como una bomba de desplazamiento positivo junto con un intensificador de presión que se utiliza para forzar el paso del fluido a través de la válvula de homogeneización (Floury *et al.*, 2004). En cualquier tipo de válvula o cámara (en microfluidización), donde se produce la homogeneización, la emulsión es sometida a alta presión a través de su paso en la válvula o cámara acelerándose y creando fuerzas de cizalla, impacto y cavitación. Como resultado, a la salida la emulsión pasa por un intercambiador de calor o un sistema de enfriamiento y posteriormente pueda ser recirculada en caso de ser necesario.

El diseño de la válvula o cámara de homogeneización es uno de los principales parámetros que influyen en la eficiencia del proceso. Es, por lo tanto, comprensible que las principales diferencias entre los homogeneizadores de diferentes fabricantes están en las válvulas/cámaras de homogeneización (Figura 1).

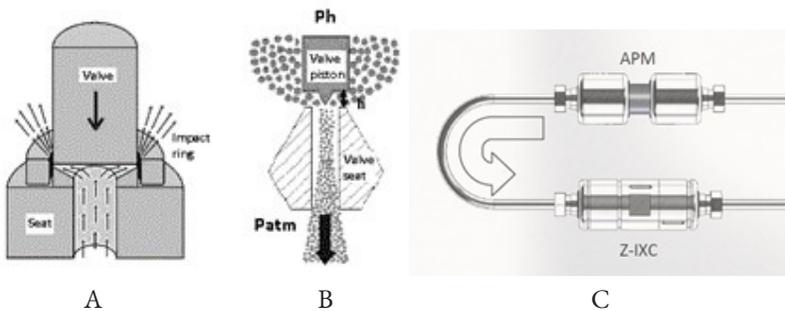


Figura 1. Tipos de válvulas/cámaras de interacción en equipos UHPH A) Válvula APV-Gaulin; B) Válvula de Stanted Fluid Power, C) Cámara de interacción Microfluidics (<https://www.microfluidics-mpt.com/microfluidizer-interaction-chambers>)

Actualmente, existen diferentes tipos de equipos, tanto a nivel prototipo como a escala industrial, por ejemplo: APV-Gaulin (EE.UU.), APV-Rannie (Dinamarca) y Panda (Gea Niro Soavi SPA, Parma, Italia). Son equipos capaces de alcanzar presiones de 150 MPa. Microfluidica (Microfluidics™ International Corporation, Newton, MA, EE.UU.), Nanojet (Nanojet™, Haskel, EE.UU.), Emulsiflex (Avestin®, Canadá) y Stansted (Stansted Fluid Power Ltd, Essex, Reino Unido) están diseñados para trabajar a presiones por encima de los 200 MPa (equipos UHPH).

Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron utilizando aceite de CBD comercial (Kaneh Bioinnovations®) con una concentración de 50mg/mL, quitosano grado alimenticio (GD 85%) con peso molecular de 280,000–350,000 adquirido de Vepinsa S.A de C.V. y goma guar, Tween 20, Tween 80 y Span 20 de Sigma Aldrich S. de R.L de C.V. Se utilizó agua desionizada en todos los experimentos.

Se utilizó la metodología presentada en la Figura 2 para la elaboración de cuatro formulaciones diferentes: cc80 (Aceite de coco + Tween 80), cbdT80 (aceite CBD + Tween 80), ccTS20 (aceite de coco + Tween20/Span 20) y cbdTS20 (aceite CBD + Tween 20/Span 20), con una composición porcentual de 85% fase acuosa, 15% fase oleosa y 5% surfactante.

Para la formulación se mezcló quitosano y goma guar al 1% en una proporción 50:50, posteriormente se incorporó la parte oleosa hasta homogeneizar. Dicha parte oleosa la conformaron los aceites con los que se trabajó, los cuales fueron aceite de coco y aceite de CBD. Para que una emulsión pueda formarse es necesaria la incorporación de agentes emulsionantes o surfactantes, por lo que se incorporaron Tween 80 y una mezcla de Tween 20 y Span 20. Se homogenizaron ambas partes usando un mezclador de alto cizallamiento (Silverson Machines, Inc.USA) a 5000 rpm por 15 min. Posteriormente, la solución se pasó a través de un homogeneizador a ultra alta presión M-110PS Microfluidizer®, (Microfluidics Microfluidics Corp., New-

ton, MA, USA) con una cámara de interacción Tipo Y de diamante de 75 μm de diámetro (F12Y) usando una presión de 200 MPa como condición experimental y tomando muestra en los ciclos 1, 5 y 10. De esta manera se obtuvieron nanoemulsiones que fueron monitoreadas respecto a su estabilidad durante 10 días. Se realizaron observaciones a través de un microscopio óptico (Leica Microsystems DM500, GmbH, Wetzlar, DE) de una gota de las nanoemulsiones preparadas a una magnificación de 10 y 100X. Se midió el tamaño de las partículas (Z-avg) en cada nanoemulsión utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, Reino Unido). Se midieron tres alícuotas separadas de la misma muestra en condiciones idénticas, cada uno con tres réplicas de mediciones.

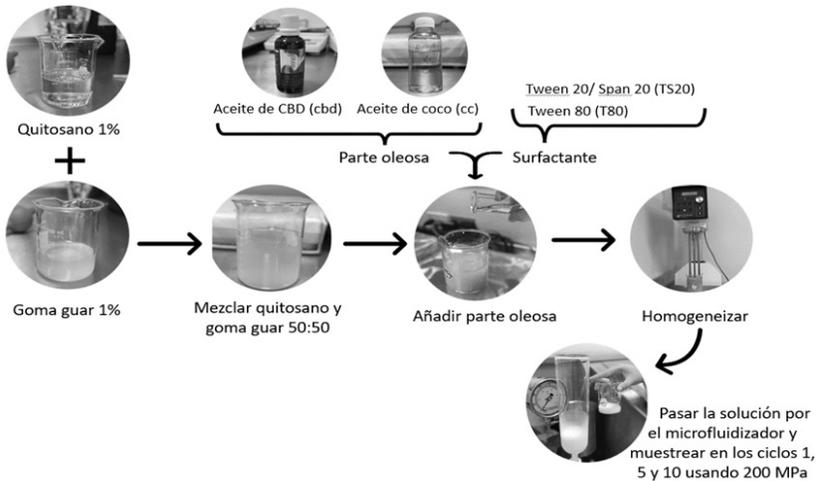


Figura 2. Metodología empleada para la formulación y obtención de las nanoemulsiones por UHPH

Resultados y discusión

La microfluidización es un método utilizado para la producción de materiales de tamaño micro y nanométrico que se utiliza comúnmente para emulsiones (aceite en agua O/W o viceversa W/O), liposomas y

encapsulaciones de polímeros. La alta presión desintegra las micelas de la solución utilizando fuerzas de cizallamiento y eventualmente se rompen las partículas o micelas (Yurdacan & Murat, 2021).

Tamaño de partícula de las emulsiones

Se observó una disminución en el tamaño de partícula en las nanoe-mulsiones a través del microscopio óptico con los objetivos 10x y 100x en los ciclos 1, 5, y 10 (Figura 3). Antes de hacer pasar la solución por el microfluidizador se apreciaban visualmente las micelas y conforme se hizo pasar la solución por los ciclos 1, 5 y 10, el tamaño de su partícula fue menor. En el ciclo 10 no se observaron micelas en ambos objetivos, por lo que se consideró que el tamaño de estas era menor, entre 30 y 500 nm.

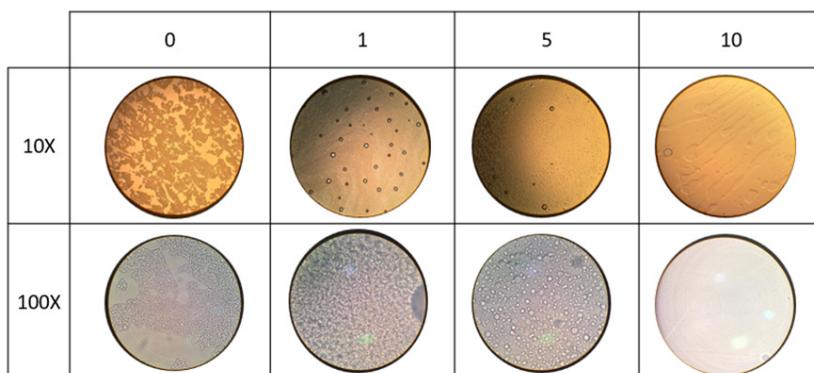


Figura 3. Disminución del tamaño de partícula de las emulsiones observadas a 10x y 100x en un microscopio óptico

Con la técnica DLS (Dispersión de luz dinámica) se verificó que se alcanzó un tamaño de partícula menor a 100 nm después de 5 ciclos para todas las soluciones, excepto para cbdTS20 en donde se obtuvo un tamaño de partícula de 253.7 nm para la mezcla de Tween 20 y Span 20 (Figura 3). Se obtuvo la misma tendencia en la disminución de tamaño de partícula al utilizar 10 ciclos de operación.

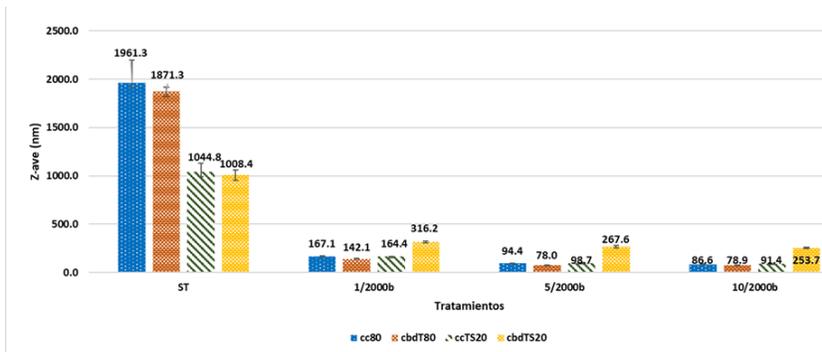


Figura 4. Tamaño de partícula (Z-avg) dependiente de los tratamientos de HPH aplicados (ciclos 1, 5 y 10 a 200MPa) para la obtención de las nanoemulsiones. Los valores de Z-avg fueron determinados vía DLS

Debido a que la mayor reducción de tamaño obtenida a partir de 5 ciclos fue la formulación cbdT80, esta se monitoreo durante 10 días, tal como se muestra en la Figura 5. Se corroboró de nueva cuenta que a partir del ciclo 5 se alcanzó un tamaño escala nanométrica, por lo que no hubo separación de fases, lo cual indicó que la solución presentó estabilidad.

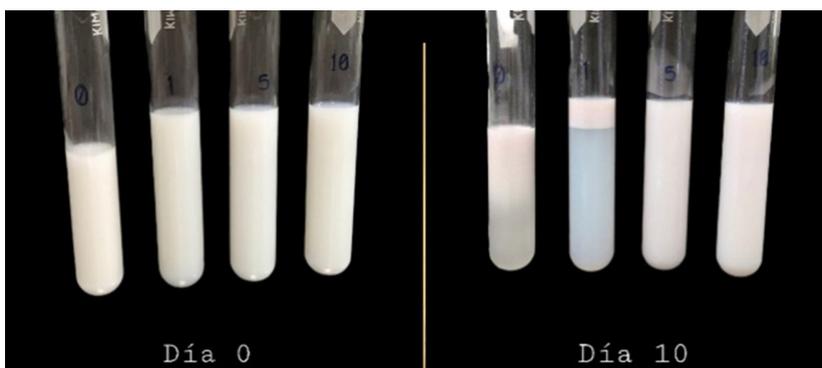


Figura 5. Evaluación de la estabilidad de las emulsiones cbdT80 en el día 0 y el día 10

Con el uso de la homogeneización a ultra-alta presión, se ha observado que las diferentes condiciones de tratamiento influyen en la estabilidad de una nanoemulsión. Por ejemplo, Desrumaux y Marcand (Desrumaux & Marcand, 2002) aplicó presiones entre 50 y 350 MPa a una emulsión de 20% aceite de girasol en solución acuosa con un 1,5% proteínas séricas, alcanzando la máxima estabilización en 100 MPa. Flourey *et al.* (2002) consiguieron la máxima estabilidad y el mínimo tamaño de gota en una emulsión con 20% de aceite de girasol y 0,75% de metilcelulosa tratados a presión de 150 MPa. Sin embargo, utilizando proteína de soya como emulsionante consiguieron estabilidad utilizando presiones de hasta 350 MPa, concluyendo que las condiciones de tratamiento también influían en la estabilidad de una emulsión. Donsi *et al.* (2011) realizó estudios complementarios para obtener nanoemulsiones de d-limoneno utilizando la homogeneización a alta presión y empleando diferentes emulsificadores como: lecitina, proteínas de guisantes, ésteres de sorbitan y una combinación de Tween 20 y glicerol monooleato.

La presión y número de pasos han sido evaluados para la formación de las nanoemulsiones (Guerra-Rosas *et al.*, 2016; Salvia-Trujillo *et al.*, 2014), dando como resultado que el tamaño de gota, la viscosidad y blancura de las nanoemulsiones disminuye al aumentar la intensidad de la presión y el número de pasos a través de la cámara de interacción en microfluidizador. A 150 MPa y 10 ciclos la nanoemulsión de aceite de limón y Tween 80 obtuvo un tamaño mínimo promedio de gota de 6 nm, resaltando la importancia de la homogeneización a alta presión como una tecnología para producir nanoemulsiones estables de aceites esenciales (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

Conclusiones

Se demostró que es posible producir nanoemulsiones de aceite de CBD comercial (<100nm) utilizando el proceso de UHPH entre 5 y 10 ciclos a una presión de 200MPa, con las formulaciones evaluadas. Las condiciones del tratamiento y el tipo de emulsificante influyeron en la estabilidad de la nanoemulsión, logrando mejores resultados con la mezcla cbdT80 (aceite CBD + Tween 80).

Referencias

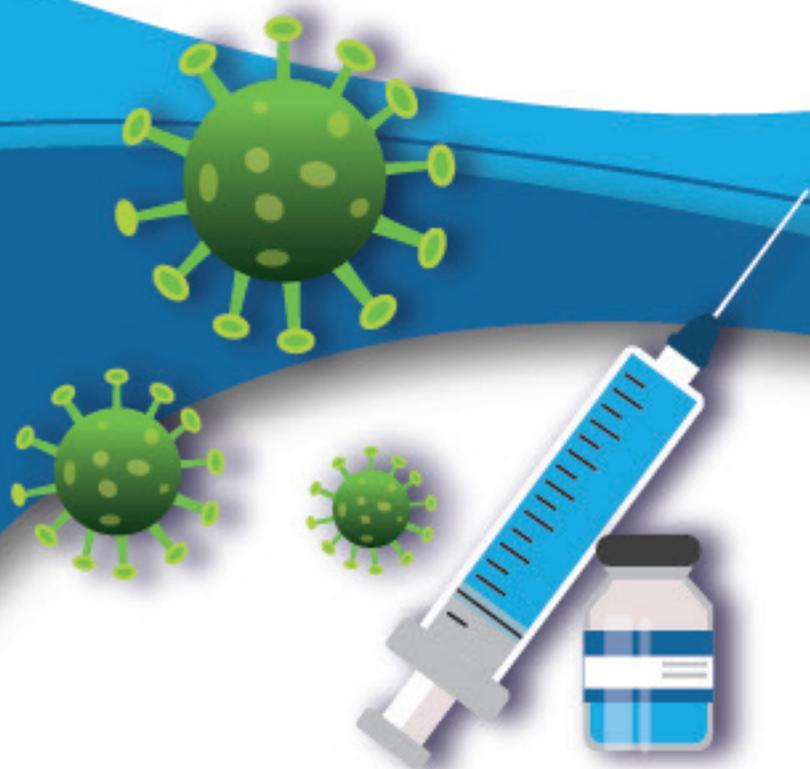
- Adelli, G. R., Bhagav, P., Taskar, P., Hingorani, T., Pettaway, S., Gul, W., ElSohly, M. A., Repka, M. A., & Majumdar, S. (2017). Development of a Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Amino Acid-Dicarboxylate Prodrug With Improved Ocular Bioavailability. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(4), 2167. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20757>
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Behl, T., Chadha, S., Sachdeva, M., Sehgal, A., Kumar, A., Dhruv, Venkatachalam, T., Hafeez, A., Aleya, L., Arora, S., Batiha, G. E. S., Nijhawan, P., & Bungau, S. (2021). Understanding the possible role of endocannabinoid system in obesity. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 152(November 2020), 106520. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2020.106520>
- Desrumaux, A., & Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(3), 263–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00565.x>
- Donsi, F., Sessa, M., Mediouni, H., Mgaidi, A., & Ferrari, G. (2011). Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion-based delivery systems. *11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)*, 1(0), 1666–1671. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.246>
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59(4), 843–853. [https://doi.org/DOI: 10.1016/j.ces.2003.11.017](https://doi.org/DOI:10.1016/j.ces.2003.11.017)
- Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. A. V, & Legrand, J. (2002). Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 47–53.

- Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, *52*, 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.017>
- Hamerle, M., Ghaeni, L., Kowski, A., Weissinger, F., & Holtkamp, M. (2014). Cannabis and other illicit drug use in epilepsy patients. *European Journal of Neurology*, *21*(1), 167–170. <https://doi.org/10.1111/ene.12081>
- Hurgobin, B., Tamiru-Oli, M., Welling, M. T., Doblin, M. S., Bacic, A., Whelan, J., & Lewsey, M. G. (2021). Recent advances in Cannabis sativa genomics research. *New Phytologist*, *230*(1), 73–89. <https://doi.org/10.1111/nph.17140>
- Kleinhenz, M. D., Magnin, G., Lin, Z., Griffin, J., Kleinhenz, K. E., Montgomery, S., Curtis, A., Martin, M., & Coetzee, J. F. (2020). Plasma concentrations of eleven cannabinoids in cattle following oral administration of industrial hemp (*Cannabis sativa*). *Scientific Reports*, *10*(1), 12753. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69768-4>
- Lee, G. W. J., & Tadros, Th. F. (1982). Formation and stability of emulsions produced by dilution of emulsifiable concentrates. Part II. The influence of surfactant concentration on the stability of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces*, *5*(2), 117–127. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(82\)80067-X](https://doi.org/10.1016/0166-6622(82)80067-X)
- Leibtag, S., & Peshkovsky, A. (2020). Cannabis extract nanoemulsions produced by high-intensity ultrasound: Formulation development and scale-up. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *60*(August), 101953. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101953>
- Liu, X., Guan, Y., Ma, Z., & Liu, H. (2004). Surface Modification and Characterization of Magnetic Polymer Nanospheres Prepared by Miniemulsion Polymerization. *Langmuir*, *20*(23), 10278–10282. <https://doi.org/10.1021/la0491908>
- Marzuki, N. H. C., Wahab, R. A., & Hamid, M. A. (2019). An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceuti-

- cal applications. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 779–797. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. En *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization* (pp. 3–20). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>
- Ozogul, Y., Karsli, G. T., Durmuş, M., Yazgan, H., Oztop, H. M., McClements, D. J., & Ozogul, F. (2022). Recent developments in industrial applications of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 304, 102685. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2022.102685>
- Rasera, G. B., Ohara, A., & de Castro, R. J. S. (2021). Innovative and emerging applications of cannabis in food and beverage products: From an illicit drug to a potential ingredient for health promotion. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.035>
- Rupasinghe, H. P. V., Davis, A., Kumar, S. K., Murray, B., & Zheļjazkov, V. D. (2020). Industrial Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules*, 25(18), 4078. <https://doi.org/10.3390/molecules25184078>
- Sadurní, N., Solans, C., Azemar, N., & García-Celma, M. J. (2005). Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 26(5), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.08.001>
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.004>

- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, *37*(0), 292–297. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.015>
- Sawtelle, L., & Holle, L. M. (2021). Use of Cannabis and Cannabinoids in Patients With Cancer. *Annals of Pharmacotherapy*, *55*(7), 870–890. <https://doi.org/10.1177/1060028020965224>
- Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J.-T., & L'Alloret, F. (2004). Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in colloid and interface science*, *108–109*, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.026>
- Taha, E. I., Al-Saidan, S., Samy, A. M., & Khan, M. A. (2004). Preparation and in vitro characterization of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate. *International journal of pharmaceutics*, *285*(1–2), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.03.034>
- Tan, C., & McClements, D. J. (2021). Application of advanced emulsion technology in the food industry: A review and critical evaluation. *Foods*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/FOODS10040812>
- Zhang, M., Cao, Q., Yuan, Y., Guo, X., Pan, D., Xie, R., Ju, X., Liu, Z., Wang, W., & Chu, L. (2023). Functional nanoemulsions: Controllable low-energy nanoemulsification and advanced biomedical application. *Chinese Chemical Letters*, 108710. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2023.108710>

Soluciones y Retos ante el **COVID-19**



INTRODUCCIÓN

La emergencia sanitaria a escala global provocada por la enfermedad denominada COVID-19 inició con la aparición de su agente etiológico en 2019, el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2). La pandemia ocasionada por este virus es la más importante en lo que va de este siglo por el número de vidas humanas que se perdieron y las secuelas asociadas a la infección. Como tal, impulsó a la industria farmacéutica y biotecnológica a encontrar soluciones a corto plazo a través de la búsqueda y generación de medicamentos y vacunas para el control del virus. Un ejemplo dramático de ello fue el desarrollo y la producción masiva de varios tipos de vacuna (vectorizada, de ARN, de subunidades) en tiempo récord: un poco más de un año a partir de la aparición del virus. Por otro lado, también incentivó la investigación de compuestos de origen natural que afectaran al virus en cualquiera de sus etapas de infección y finalmente redujeran o eliminaran su multiplicación.

En esta sección se presenta un trabajo de investigación que estudió el efecto de extractos de las algas *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira máxima*, fucoídano extraído de *Sargassum spp.* y un extracto etanólico presente en la resina de la planta desértica *Larrea tridentata* sobre la multiplicación del SARS-CoV-2 mediante ensayos *in vitro*, usando células permisivas a la infección por un aislado clínico de este virus. Se obtuvieron parámetros importantes de estos extractos, como la concentración efectiva al 50% (CE50) y el índice de selectividad (SI).

Abel Gutiérrez Ortega

EVALUACIÓN DE DOS FUENTES NATURALES DE METABOLITOS COMO AGENTES ANTIVIRALES CONTRA SARS-CoV-2

Erendira Villalobos Sánchez¹ y Darwin E. Elizondo Quiroga^{1*}

RESUMEN

La evolución entre plantas y sus enemigos naturales (insectos, hongos, bacterias, virus, etc.) han estimulado que estas se adapten y sinteticen moléculas que poseen diferentes actividades dirigidas a la supervivencia en el medio ambiente. *Chlorella* spp., *Spirulina* spp. y fucoídano, derivado de *Sargassum* spp., se comercializan como suplementos alimenticios y se consideran seguros para el consumo humano. La planta *Larrea tridentata* ha sido usada como remedio de una serie de afecciones de manera tradicional. Su efecto contra el SARS-CoV-2 sigue siendo desconocido. En este contexto, en la unidad de biotecnología médica y farmacéutica del CIATEJ estamos investigado la actividad antiviral potencial del extracto de estos agentes contra la infección por SARS-CoV-2 *in vitro*. *C. vulgaris* mostró una amplia protección de los cultivos de células; Vero, en todos los tipos de ensayos y concentraciones virales usadas, ya que no se observó CPE en ninguna réplica. La carga viral medida de este tratamiento arrojó una disminución de las copias genómicas tan baja como 1.5×10^3 a las 96 hpi. *A. maxima* también mostró protección de cultivos celulares; no se detectó CPE en cultivos desafiados con 50 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2. La carga viral presente en sobrenadantes de células desafiadas con 100 TCID₅₀/ml mostró una carga viral de 6.6×10^4 copias genómicas. El fucoídano presentó 100% de protección al reto contra 50 TCID₅₀/ml del virus, tanto en simultaneo como en pretratamiento,

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Normalistas 800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, México 44270. * delizondo@ciatej.mx

donde la carga viral presente en sobrenadantes de células desafiadas con 100 TCID₅₀/ml en simultaneo fue de 2.9×10^5 copias genómicas. El extracto de *L. tridentata*, como el NDGA, presenta protección de cultivos celulares contra 100 TCID₅₀/ml del virus SARS-CoV-2 a las 96 horas post infección y la carga genómica viral detectada fue tan solo de 3.1×10^5 copias genómicas para el extracto de la resina y de 3.8×10^3 para el compuesto NDGA purificado. En conjunto, los datos proporcionados por este trabajo demuestran que *C. vulgaris*, *A. maxima* y el fucoidano purificado Alquimar® obtenido de *Sargassum* spp., así como *L. tridentata* y el NDGA, son potentes inhibidores del SARS-CoV-2 in vitro.

PALABRAS CLAVE

Antivirales, SARS-CoV-2, *Larrea tridentata*, algas.

Introducción

Enfermedad de COVID-19

En diciembre de 2019 los centros de salud en Wuhan, China, informaron sobre un grupo de pacientes que presentaba neumonía atípica de origen desconocido. Poco después, los investigadores en ese país identificaron el agente causal como un nuevo coronavirus (CoV) de origen zoonótico y la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el 30 de enero de 2020 una emergencia sanitaria de importancia mundial debido al brote de SARS-CoV-2 (*Coronavirus disease* (COVID-19), s/f). Conforme el virus se fue propagando en todas las regiones del mundo y el número de muertos fue en aumento, la enfermedad adquirió mayor relevancia, al punto de declararse la pandemia el día 11 de marzo de 2020 (*Coronavirus Disease* (COVID-19) - Events as They Happen, s/f).

Los síntomas más comunes que se presentan en la enfermedad de COVID-19 son fiebre, fatiga, tos seca, dolor de cabeza, congestión nasal, dolor de garganta, mialgia y artralgia. Algunos pacientes pueden presentar otros síntomas menos comunes como dificultad respiratoria,

problemas gastrointestinales, síntomas músculo esqueléticos, náuseas, vómitos, diarrea, etc., (Chen *et al.*, 2020; Cipollaro *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Una minoría de pacientes con comorbilidades tales como hipertensión, diabetes y/o enfermedades cardiovasculares podrían presentar complicaciones tales como insuficiencia cardíaca, respiratoria y hepática, lo que podría conducir a la muerte (Xu *et al.*, 2020). Desde su aparición en 2019, el SARS-CoV-2 ha infectado más de 768 millones de personas alrededor del mundo y ha ocasionado cerca de 6.9 millones de muertes (Tablero COVID-19 de la OMS, s/f).

Coronavirus, estructura y genoma

Los coronavirus pertenecen a la familia Coronaviridae, del orden de los Nidovirales y subfamilia Orthocoronavirinae que se clasifican en cuatro géneros distintos: Alphacoronavirus (α -CoV), Betacoronavirus (β -CoV), Deltacoronavirus (δ -CoV) y Gammacoronavirus (γ -CoV), que infectan más de 20 especies de mamíferos, aves y vertebrados (Santacroce *et al.*, 2021; van Regenmortel *et al.*, 2000; Viruses, 2020). Se conocen siete especies que infectan humanos de las cuales tres (MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2) causan síndrome respiratorio agudo severo con altas tasas de mortalidad. Basándose en las relaciones filogenéticas, el virus SARS-Cov-2 pertenece a los betacoronavirus y tiene similitudes de hasta 96% con el genoma completo de los virus detectados en murciélagos (Ge *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020); además, el análisis genético reveló que está genéticamente relacionado con la cepa que provocó el brote epidémico de SARS en 2003 (Okada *et al.*, 2020).

La partícula viral presenta una morfología esférica de un diámetro de entre 80 a 120 nanómetros (Masters, 2006). En su interior se encuentra la nucleocápside, en donde el material genético está asociado a la proteína N, la cual se encuentra fosforilada y anclada a la bicapa de lípidos de la envoltura externa (Jack *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2021). La estructura viral está constituida por proteínas de espiga (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N) (Zeng *et al.*, 2020) (Figura 1). El virus también posee 16 proteínas no estructura-

les (nsp1 a nsp16) que constituyen un complejo de replicación y dos enzimas metiltransferasas implicadas en la formación del casquete de ARNm viral (cas).

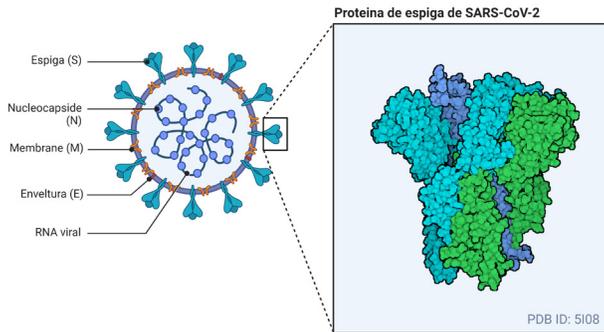


Figura 1. Estructura del virión de SARS-CoV-2. La partícula viral posee una nucleocápside compuesta por ARN genómico asociado a la proteína (N) y está recubierta por una envoltura (E) externa de proteínas de espiga (S) y de membrana (M)

Mecanismo de infección

Para que ocurra la replicación del SARS-CoV-2 es necesaria la correcta interacción del virus con la célula hospedera. La entrada celular es el primer paso para la infección viral y se puede dividir en dos pasos: la unión celular y fusión de membranas. Primeramente, el SARS-CoV-2 se une al receptor de la célula huésped a través de la proteína S de superficie a la enzima convertidora de angiotensina -2 (ACE-2), la cual tiene como función la regulación de la presión sanguínea y se expresa principalmente en tejidos como pulmones, tracto respiratorio, corazón, intestino delgado, cavidad oral y riñones. Una vez que sucede el reconocimiento, la proteína S se escinde por

la proteasa transmembranal serina 2 (TMPRSS-2) en dos subunidades, la S1 posee al receptor RBD y la S2, que contiene un péptido (aminoácidos 816-836) que induce la fusión de las membranas viral y plasmática, facilitando el proceso de fusión e ingreso del material genético al citoplasma de la célula huésped, mediado por endocitosis en donde se comienza el proceso de transcripción y replicación del virus (Yan *et al.*, 2022).

Antivirales de origen natural

La evolución entre plantas y sus enemigos naturales (insectos, hongos, bacterias, virus, etc.) han estimulado que estas se adapten y sinteticen moléculas que poseen diferentes actividades dirigidas a la supervivencia en el medio ambiente. En ese sentido, los extractos de diferentes fuentes naturales son un material biológico muy importante que a lo largo de muchas décadas han proporcionado moléculas con potencial farmacológico.

En este contexto, en la unidad de biotecnología médica y farmacéutica del CIATEJ, en la sublínea de Desarrollo y Evaluación de productos con potencial terapéutico, decidimos investigar el efecto antiviral de los extractos de las algas *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira maxima* y fucoidano extraído de *Sargassum* spp., así como un extracto etanólico de la resina de la planta *Larrea tridentata*, contra la infección *in vitro* por el virus SARS-CoV-2.

Metodología

Para la realización de todos los ensayos se utilizó la línea celular Vero-CCL-81. Todos los experimentos relacionados con el SARS-CoV-2 (Genbank: ON457663.1) se llevaron a cabo en las instalaciones del CIATEJ BSL-3. Los extractos *C. vulgaris*, *A. maxima* y el de fucoidano (Alquimar ® 250,61 kDa) fueron proporcionadas por la empresa Creamos Más. El extracto de *L. tridentata* fue producido en CIATEJ mediante extracción secuencial con solventes orgánicos de la resina de las hojas. Adicionalmente, se probó el ácido nordihidroguayaretico

(NDGA), que es el compuesto mayoritario de la resina de la planta. La metodología general para la búsqueda de antivirales de los extractos naturales se muestra en la Figura 2.

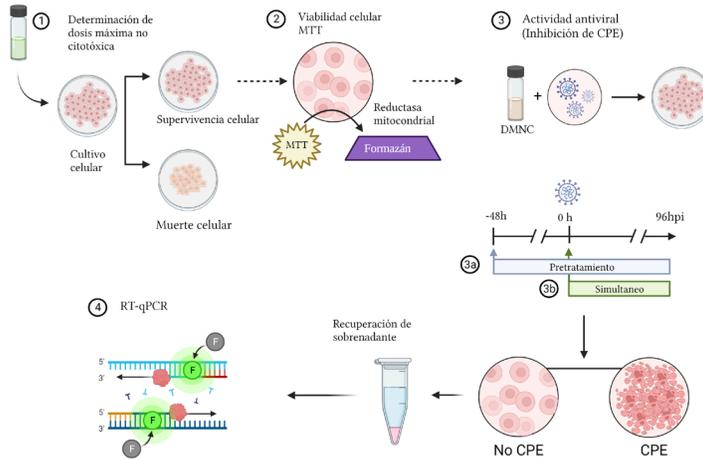


Figura 2. Metodología general para la búsqueda de antivirales de extractos de fuentes naturales

Para identificar la concentración máxima no citotóxica (CMNC), se probaron diferentes concentraciones de cada extracto para identificar las concentraciones que no presentaran daño detectable bajo el microscopio invertido como pérdida de confluencia, redondeo celular o vacuolización, en comparación con el control no tratado. Adicionalmente, se realizaron ensayos de MTT para conocer la viabilidad celular de las dosis seleccionadas para ser utilizadas en los ensayos de actividad antiviral, además de usar esta técnica para encontrar la concentración citotóxica media CC_{50} .

Para determinar la posible protección antiviral de los extractos contra SARS-CoV-2, se realizaron dos tipos de experimentos: en simultáneo (Adición de CMNC del extracto más el virus) y en pretratamiento (Adición de CMNC de extractos por 48 hrs. en células Vero previo a la infección con el virus). Todos los experimentos fueron

realizados en placas de 96 pozos contiendo monocapas confluentes de células Vero. Las placas se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ por 4 días, revisándose diariamente bajo el microscopio invertido en la búsqueda de efecto citopático (CPE). Posteriormente, se realizó la recuperación de los sobrenadantes de los experimentos para la extracción de los ácidos nucleicos, que se utilizaron para la cuantificación de cargas virales por RT-qPCR.

Para comprender el efecto dosis-respuesta de los extractos de las algas contra el virus, se estimó la concentración efectiva al 50% (CE₅₀), que es la concentración de la muestra en la que las copias genómicas se reducen un 50% en comparación con el control positivo, realizando un ensayo de actividad antiviral bajo el esquema simultáneo, utilizando 5 concentraciones diferentes (25, 50, 70 y 120 µg/ml) contra 100 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2. La placa se incubó a 37 °C y CO₂ al 5%, las células se observaron diariamente para determinar la presencia de efecto citopático.

Para encontrar el índice de selectividad (SI), se analizó un rango de 0 a 1000 µg/ml de cada muestra, usando el ensayo MTT para evaluar la concentración citotóxica 50% de la muestra (CC₅₀), que es la concentración con una reducción del 50% en la viabilidad celular y el índice de selectividad se estimó como la relación entre CE₅₀ y CC₅₀.

Resultados

Concentración máxima no citotóxica de las muestras

Para identificar la CMNC, en el caso de los extractos de algas, se probaron tres concentraciones diferentes de cada muestra (50, 70 y 100 µg/ml). Las concentraciones de 50 y 70 µg/ml no mostraron daño detectable como pérdida de confluencia, redondeo celular o vacuolización en comparación con el control no tratado. Se observaron algunas modificaciones en el monocapa celular a 100 µg/ml, por lo que se seleccionó la concentración de 70 µg/ml para ensayos antivirales adicionales. Los ensayos de MTT mostraron una viabilidad celular del 81.8%, 75.3% y 79.7% para *C. vulgaris*, *A. maxima* y

fucoidano respectivamente, 96 horas después del tratamiento a una concentración de 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para *L. tridentata* las concentraciones probadas fueron de 0 -16.6 ng/mL , donde se seleccionó la concentración de 11.1 ng/ml para los ensayos antivirales. De igual forma, se evaluó la CMNC y viabilidad celular del NDGA del rango de concentraciones de 0-150 μM , siendo 35 μM la CMNC seleccionada para esta molécula (Figura 3).

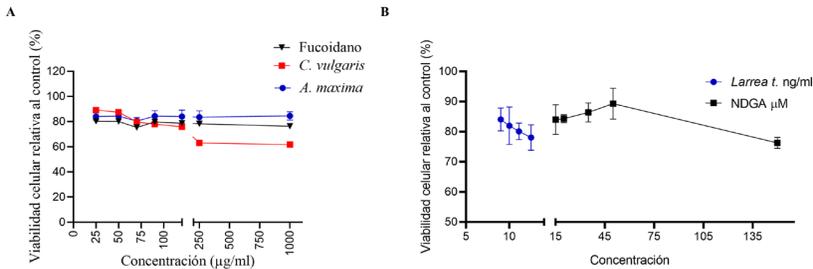


Figura 3. Viabilidad celular de extractos a las 96 horas post tratamiento. La citotoxicidad de los extractos fue determinada mediante viabilidad celular por MTT. (A) Viabilidad celular de algas; (B) Viabilidad celular de extracto de *Larrea t.* y NDGA expresado en μM y ng/ml respectivamente. Cada valor representa la media de tres réplicas \pm desviación estándar (DE)

Ensayos antivirales

Para determinar la posible actividad antiviral de los extractos frente al SARS-CoV-2, se realizaron dos tipos de experimentos (simultáneo y pretratamiento), en presencia de 50 o 100 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2. Cuando la CMNC de *C. vulgaris* fue desafiada contra 50 y 100 TCID₅₀/ml, ninguna réplica se infectó (no aparición de CPE = 0% de infección) para ambos tipos de experimento. En el caso de *A. maxima*, en 50 TCID₅₀/ml no se observó CPE para ambos experimentos; sin embargo, cuando la concentración viral se incrementó a 100 TCID₅₀/ml, se observó CPE en el esquema de pretratamiento (12,5% de infección), pero no apareció CPE en el ensayo simultáneo. En el caso de fucoidano usando 50 TCID₅₀/ml, no se observó

CPE (0% de infección) para ambos esquemas experimentales. Sin embargo, usando 100 TCID₅₀/ml del virus, en el pretratamiento se observó un 75% de infección, pero no apareció CPE en el ensayo simultáneo (0% de infección). En el caso de *L. tridentata*, todas las muestras mostraron 0% de infección en ambos tipos de experimento (Tabla 1). En la Figura 4 se muestran fotografías representativas de los ensayos antivirales previamente descritos en donde se muestra el efecto citopático causado por el virus SARS-CoV-2 a las 96 horas post infección (Figura 4-B) y el tratamiento en simultaneo con el extracto del alga (*C. vulgaris* + 100 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2) en donde no se observó CPE (Figura 4-C).

Tabla 1. Comparación en el porcentaje de infección entre cultivos infectados con 50 o 100 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2

	50 TCID ₅₀ /ml		100 TCID ₅₀ /ml	
	Pretratamiento	Simultaneo	Pretratamiento	Simultaneo
<i>C. vulgaris</i>	0% ****	0% ****	0% ****	0% ****
<i>A. maxima</i>	0% ****	0% ****	12.5% **	0% ****
Fucoidano	0% ****	0% ****	75%	0% ****
<i>L. tridentata</i>	0% ****	0% ****	0%	0% ****

Todos los ensayos se llevaron a cabo con 8 repeticiones. Los resultados se dan en porcentaje de infección (aparición de CPE en las réplicas). ANOVA de 1 vía **** valor $p < 0,0001$. ** $< 0,001$ * $< 0,01$.

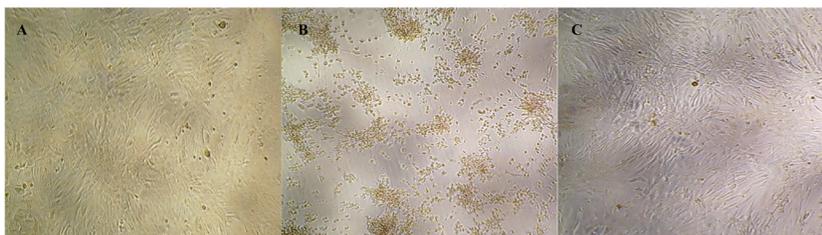


Figura 4. Fotografías representativas de los cultivos de células Vero CCL-81 a las 96 horas post infección con el virus SARS-CoV-2. A: Control negativo (células sin tratar); B: Control positivo 100 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2 presentando CPE (Desprendimiento y redondeamiento celular); C: Células Vero infectadas con 100 TCID₅₀/ml de SARS-CoV-2 y tratadas con 70 µg/ml de extracto de *C. vulgaris*

Carga viral en los ensayos antivirales

Para investigar más a fondo el efecto antiviral de las diferentes muestras de extractos en la infección por SARS-CoV-2, se cuantificaron las copias del genoma viral mediante RT-qPCR del ensayo simultáneo. Se colectaron tres sobrenadantes representativos de cada tratamiento y su control positivo para el ensayo de RT-qPCR. Cuando se infectó con $100 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$, la carga viral aumentó en el control positivo alcanzando una carga genómica de 8.8×10^6 copias genómicas a las 96 horas. Todos los extractos utilizados como tratamiento en simultáneo inhibieron la infección por SARS-CoV-2 *in vitro* (Tabla 1), presentando cargas virales en un rango de 1.5×10^3 a 3.1×10^5 copias genómicas en los diferentes tratamientos, siendo estas cargas genómicas equivalentes al inóculo inicial de infección. El análisis estadístico fue determinado mediante un análisis de varianza one-way ANOVA para múltiples comparaciones, revelando diferencias significativas con valores **** $p < 0.0001$ (Figura 5).

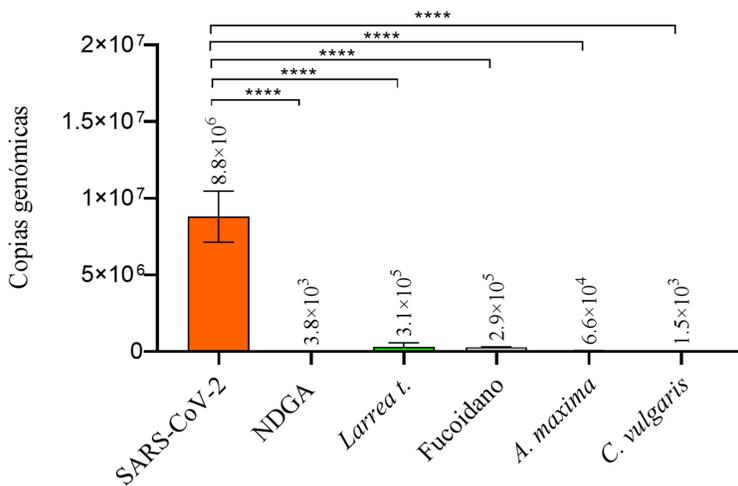


Figura 5. Cuantificación de RNA genómico viral en tratamientos a las 96 horas post infección. La significancia estadística fue determinada mediante un análisis ANOVA con la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples con el control positivo de SARS-CoV-2. **** $P < 0.0001$

Efecto dosis-respuesta de las algas

Para encontrar el índice de selectividad (SI) se estimó la CE_{50} y la CC_{50} . Para encontrar la CE_{50} de los extractos de algas y el fucoidano se realizaron ensayos antivirales simultáneos en un rango de concentraciones de 1–120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a 100 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ de SARS-CoV-2 y se cuantificaron las cargas genómicas obtenidas a las 96 horas post infección. Para encontrar la CE_{50} del NDGA se evaluó un rango de concentraciones de 2–35 μM para reducir el efecto citopático causado por el virus SARS-CoV-2 en las réplicas del ensayo. Las CE_{50} de todos los extractos evaluados se estimaron mediante un análisis de regresión no lineal en un curva dosis-respuesta. Los resultados de CE_{50} fueron 50.91, 53.12 y 53.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para *C. vulgaris*, *A. maxima* y fucoidano respectivamente. La CE_{50} obtenida para le NDGA fue de 16.97 μM .

Para estimar la CC_{50} se evaluó la viabilidad celular de diferentes concentraciones de los extractos mediante un ensayo MTT. Los resultados obtenidos mostraron que una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ posee una viabilidad celular de 86, 76 y 62% para *C. vulgaris*, *A. maxima* y fucoidano respectivamente, por lo cual se determinó la $CC_{50} \geq 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$. En el caso del NDGA, la viabilidad celular por MTT se evaluó hasta 150 μM , obteniendo una CC_{50} de 99.82 μM . El SI se estimó como CC_{50}/CE_{50} con resultados $\geq 19,64$, $\geq 18,82$, $\geq 18,58$ y 5.88 para *C. vulgaris*, *A. maxima*, fucoidano y NDGA respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de selectividad de extractos antivirales. CC_{50} : Concentración citotóxica al 50%; EC_{50} : Concentración efectiva al 50%

Muestra	CC50	EC50	SI
<i>C. vulgaris</i>	$\geq 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$	50.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$	19.64
<i>A. maxima</i>	$\geq 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$	53.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$	18.82
Fucoidano	$\geq 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$	53.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$	18.58
NDGA	99.82 μM	16.97 μM	5.88

Discusión y conclusiones

En los últimos años el uso de *Chlorella* y *Spirulina* seca como suplementos alimenticios y nutracéuticos ha aumentado sustancialmente, considerándose una excelente fuente de proteína no animal y se usan ampliamente como suplemento dietético, especialmente en dietas veganas (García-Ruiz *et al.*, 2022). La bio-actividad asociada con fucoidano extraído de diferentes algas incluye efectos antioxidantes, antitumorales, anticoagulantes, antitrombóticos, antivirales, entre otros (Luthuli *et al.*, 2019). Estas algas no solo han demostrado ser seguras para el consumo humano, sino que también son fáciles de producir y están disponibles a bajo precio en todo el mundo. Para el NDGA de *L. tridentata*, varias publicaciones han reportado propiedades antivirales, por ejemplo, inhibición de la replicación del DENV (Soto-Acosta *et al.*, 2014) y aumento de la expresión de PPAR α y la proteína cinasa activada (AMPK) en un modelo de infección del virus de la hepatitis C (Syed & Siddiqui, 2011), además de que también se ha reportado actividad antioxidante y anticancerígena (Fujimoto *et al.*, 2004; McDonald, 2000). Los resultados presentados por nuestro grupo de trabajo sugieren que los extractos de *C. vulgaris*, *A. maxima*, fucoidano y *L. tridentata*, incluido el NDGA, tienen potencial para usarse como inhibidores de virus contra el SARS-CoV-2.

C. vulgaris mostró una amplia protección de los cultivos de células Vero en todos los tipos de ensayos y concentraciones virales, ya que no se observó CPE en ninguna réplica. La carga viral medida de este tratamiento arrojó una disminución de las copias genómicas tan baja como 1.5×10^3 copias genómicas a las 96 hpi.

A. maxima también mostró protección de cultivos celulares. No se detectó CPE en cultivos desafiados con $50 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ de SARS-CoV-2; sin embargo, mostró protección parcial (87.5%) cuando la concentración viral se incrementó a $100 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ en pretratamiento. La carga viral presente en sobrenadantes de células desafiadas con $100 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ mostró una carga viral de 6.6×10^4 copias genómicas.

El fucoidano presentó 100% de protección al reto contra $50 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ del virus, tanto en simultaneo como en pretratamiento,

pero no así al aumentar la carga viral a 100 TCID₅₀/ml donde protegió al 100% los cultivos solo en el esquema de simultaneo, pero no en pretratamiento donde el CPE estuvo presente en el 75% de las réplicas. La carga viral presente en sobrenadantes de células desafiadas con 100 TCID₅₀/ml en simultaneo fue de 2.9×10^5 copias genómicas.

La actividad antiviral del ácido nordihidroguaiaretico presente en la resina de la planta *L. tridentata* ha sido previamente reportada contra virus con envoltura como ZIKV, DENV, WNV, entre otros. Algunos autores sugieren que la actividad antiviral del NDGA podría estar involucrada en diferentes mecanismos como la regulación lipídica, inhibición de la entrada viral y replicación del genoma. En nuestros experimentos demostramos que tanto el extracto de *L. tridentata* como el NDGA presenta protección de cultivos celulares contra 100 TCID₅₀/ml del virus SARS-CoV-2 a las 96 horas post infección y la carga genómica viral detectada fue tan solo de 3.1×10^5 copias genómicas para el extracto de la resina y de 3.8×10^3 para el compuesto NDGA purificado.

En conjunto, los datos proporcionados por este trabajo demuestran que *C. vulgaris*, *A. maxima* y el fucoidano purificado Alquimar® obtenido de *Sargassum* spp., así como *L. tridentata* y el NDGA, son potentes inhibidores del SARS-CoV-2 *in vitro*. Finalmente, los resultados de la presente investigación sugieren que estas algas pueden tener un uso potencial en el tratamiento de infecciones por SARS-CoV-2; sin embargo, se necesitan más investigaciones, estudios preclínicos y clínicos para respaldar esta suposición.

Referencias

- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., & Wei, Y. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *The lancet*, *395*(10223), 507–513.
- Cipollaro, L., Giordano, L., Padulo, J., Oliva, F., & Maffulli, N. (2020). Musculoskeletal symptoms in SARS-CoV-2 (COVID-19) patients. *Journal of orthopaedic surgery and research*, *15*(1), 1–7.
- Coronavirus disease (COVID-19)*. (s/f). Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 20 de diciembre de 2021, de https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1
- Coronavirus Disease (COVID-19)—Events as they happen*. (s/f). Recuperado el 2 de enero de 2023, de <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
- Fujimoto, N., Kohta, R., Kitamura, S., & Honda, H. (2004). Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). *Life sciences*, *74*(11), 1417–1425.
- García-Ruiz, D., Villalobos-Sánchez, E., Alam-Escamilla, D., & Elizondo-Quiroga, D. (2022). In vitro inhibition of SARS-CoV-2 Infection by dry algae powders. *Scientific Reports*, *12*(1), 17101.
- Ge, X.-Y., Li, J.-L., Yang, X.-L., Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., Mazet, J. K., Hu, B., Zhang, W., & Peng, C. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, *503*(7477), 535–538.
- Jack, A., Ferro, L. S., Trnka, M. J., Wehri, E., Nadgir, A., Nguyenla, X., Fox, D., Costa, K., Stanley, S., & Schaletzky, J. (2021). SARS-CoV-2 nucleocapsid protein forms condensates with viral genomic RNA. *PLoS Biology*, *19*(10), e3001425.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., & Zhang, H. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, *310*(5748), 676–679.

- Lin, L., Jiang, X., Zhang, Z., Huang, S., Zhang, Z., Fang, Z., Gu, Z., Gao, L., Shi, H., & Mai, L. (2020). Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut*, *69*(6), 997–1001.
- Lu, S., Ye, Q., Singh, D., Cao, Y., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Villa, E., Cleveland, D. W., & Corbett, K. D. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature communications*, *12*(1), 1–15.
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., & Tong, H. (2019). Therapeutic effects of fucoidan: A review on recent studies. *Marine drugs*, *17*(9), 487.
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, *66*, 193–292.
- McDonald, R. W. (2000). *Synthesis and anticancer activity of NDGA and analogues*. University of Glasgow (United Kingdom).
- Okada, P., Phuygun, S., Thanadachakul, T., Parnmen, S., Wongboot, W., Waicharoen, S., Wacharapluesadee, S., Uttayamakul, S., Vachiraphan, A., & Chittaganpitch, M. (2020). Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Eurosurveillance*, *25*(8), 2000097.
- Santacroce, L., Charitos, I. A., Carretta, D. M., De Nitto, E., & Lovero, R. (2021). The human coronaviruses (HCoVs) and the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection. *Journal of Molecular Medicine*, *99*(1), 93–106.
- Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Syed, G. H., Siddiqui, A., & Del Angel, R. M. (2014). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. *Antiviral research*, *109*, 132–140.
- Syed, G. H., & Siddiqui, A. (2011). Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. *Hepatology*, *54*(6), 1936–1946.
- Tablero COVID-19 de la OMS. (s/f). Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 29 de junio de 2023, de <https://covid19.who.int/>

- van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Carstens, E., Estes, M., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M., McGeoch, D., & Pringle, C. (2000). *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
- Viruses, C. (2020). Of TIC on T. of & Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndromerelated coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5, 536–544.
- Xu, X. W., Wu, X. X., Jiang, X. G., Xu, K. J., Ying, L. J., Ma, C. L., Li, S. B., Wang, H. Y., Zhang, S., Gao, H. N., Sheng, J. F., Cai, H. L., Qiu, Y. Q., & Li, L. J. (2020). Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ (Clinical research ed.)*, 368, m606. <https://doi.org/10.1136/bmj.m606>
- Yan, W., Zheng, Y., Zeng, X., He, B., & Cheng, W. (2022). Structural biology of SARS-CoV-2: Open the door for novel therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–28.
- Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., Mohammed, A., Zhao, C., Yang, Y., & Xie, J. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 527(3), 618–623.
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., & Huang, C.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273.

