



Acta Agronómica

Vol 68 (3)

julio - septiembre 2019 / July - September 2019

ISSN 0120 - 2812

e-ISSN 2323-0118



68-3

Sede
Palmira



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Comité Editorial / Editorial Board

Arnulfo Gómez Carabali

Editor Jefe / in Chief

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
agomezcar@unal.edu.co

America Josefina Quintero Chacón

Universidad Nacional del Táchira, Venezuela
americajquintero@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0001-9377-7086>

Arcangelo Loss

Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil
arcangelo.loss@ufsc.br
<http://orcid.org/0000-0002-3005-6158>

Felipe Rafael Garcés Fiallos

Universidad de Guayaquil, Ecuador
felipegarces23@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0002-1795-4439>

Francisco Cruz Sosa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México
cuhp@xanum.uam.mx
<http://orcid.org/0000-0002-7127-7264>

Gisella S. Cruz García

Oxfam Novib, La Haya, Países Bajos
gisella.cruzgarcia@oxfamnovib.nl
<http://orcid.org/0000-0002-2699-3157>

Juan Humberto Avellaneda Cevallos

Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador
juan.avellaneda@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1805-4803>

Javier Antonio Benavides Montano

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
abenavidesm@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0003-3247-5994>

Joel Tupac Otero Ospina

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
jtoteroo@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0002-0810-183X>

John Ocampo

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
jaocampop@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0002-2720-7824>

José Luis Chávez Servia

Instituto Politécnico Nacional, México
jchavez@ipn.mx
<http://orcid.org/0000-0002-8816-4127>

Luis Carlos Martínez

Universidad Federal de Viçosa-MG, Brasil
lc.martinez@outlook.com
<http://orcid.org/0000-0001-7741-2984>

Luis Fernández Portillo

Universidad de Loyola, Andalucía, España
portillo@uloyola.es
<http://orcid.org/0000-0001-7152-5267>

Maia Fradkin

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Argentina, Argentina
maiafradkin@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-1575-7634>

María Aurora Londoño Avendaño

Universidad de Valle - Santiago de Cali, Colombia
maria.avendano@correounivalle.edu.co

María del Mar Delgado Serrano

Universidad de Córdoba Escuela T.S. de Ingeniería Agronómica y Montes, España
mmdelgado@uco.es
<http://orcid.org/0000-0003-0171-6079>

María Fernanda Quintero Castellanos

Universidad autónoma de san Luis Potosí, México
mfquinteroc@unal.edu.co
<http://orcid.org/0000-0002-9130-0679>

Marinaldo Divino Ribeiro

Universidad Autónoma de Barcelona, CREAM, Brasil
fgojedac@unal.edu.co

Mercedes del Río Celestino

Instituto de Investigación y Formación Agraria y pesquera (IFAPA), España
mercedes.rio.celestino@juntadeandalucia.es
<http://orcid.org/0000-0001-9130-2669>

Patrick Lavelle

Universidade Federal de Viçosa-MG, Brasil
plavelle48@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-2127-1067>

Pedro Mercado Ruaro

Instituto de Biología, UNAM, México
mruaro@ib.unam.mx

Ramón Diez Matallana

Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú
rdiez@lamolina.edu.pe
<http://orcid.org/0000-0001-8247-1452>

Sérgio Ruffo Roberto

Universidade Estadual de Londrina, Brasil
sroberto@uel.br
<http://orcid.org/0000-0003-2357-187X>

Silvia López Ortíz

Colegio de Posgraduados, Campus Veracruz, México
silvialopez@colpos.mx
<http://orcid.org/0000-0002-5202-3365>

Código QR sitio web



Comité Científico / Scientific Committee

Juan Pablo Martínez Dávila

COLPOS, Colegio de Posgraduados, Veracruz, Estado de Veracruz, México.
jpmartin@colpos.mx

Julián Ramírez Villegas

Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Valle del Cauca,
Colombia
j.r.villegas@cgiar.org
<http://orcid.org/0000-0002-8044-583X>

Félix Hernández Hernández

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) Universitat Jaume I
Castellón, España
hernandf@uji.es
<http://orcid.org/0000-0003-1268-3083>

Charlotte Poschenrieder Wiens

Universidad Autónoma de Barcelona, España.
charlotte.poschenrieder@uab.cat

Pablo Rafael Speranza Gastaldi

Universidad Nacional Autónoma de México, México.
mruaro@ib.unam.mx
<http://orcid.org/0000-0003-3457-0151>

Daniel Debouck

Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, Palmira-Valle,
Colombia
d.debouck@cgiar.org

Margarida L R Aguiar-Perecin

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". (ESALQ)/Universidade
de São Paulo, Brasil
mlrapere@usp.br

Paulo Roberto Da Silva

Universidade Estadual do Centro-Oeste, Brasil
prsilva@unicentro.br

Andrea Liliana Clavijo McCormick

Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany. University Ökologie.
Zürich, Schweiz
andrea.clavijo@usys.ethz.ch

Gisella Susana Cruz García

CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Valle del
Cauca, Colombia
g.s.cruz@cgiar.org

Idupulapati M. Rao

Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira, Valle del Cauca,
Colombia
i.rao@cgiar.org
<http://orcid.org/0000-0002-8381-9358>

Mercedes del Río Celestino

Instituto de Investigación y Formación Agraria y pesquera (IFAPA). La
Mojonera, Almería-España
mercedes.rio.celestino@juntadeandalucia.es
<http://orcid.org/0000-0001-9130-2669>

Marcelo Guerra

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
mguerra@ufpe.br
<http://orcid.org/0000-0003-1438-9742>

Código QR sitio web



ACTA AGRONÓMICA

Vol.: 68, No.: 3, julio - septiembre 2019 / Vol.: 68, Issue.: 3, July - September 2019

ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118

Misión / Mission

Revista Acta Agronómica

Misión: Misión: La revista Acta Agronómica, editada trimestralmente por la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, publica artículos científicos en español e inglés, de trabajos en los ámbitos de las Ciencias Agrarias y del Desarrollo Rural Sostenible, de autores afiliados a organizaciones educativas e investigativas de Colombia, de las naciones de la Comunidad Andina, de América Latina, del Caribe y de Iberoamérica. Los artículos de revisión se escriben a solicitud del Comité Editorial de la revista. Las opiniones son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Envío de documentos y correspondencia: actaagronomica_pal@unal.edu.co

Redacción de manuscritos: En esta edición se publica la Guía Abreviada para la redacción de manuscritos. Al documento "Instrucciones a los Autores" se puede acceder en el sitio web: www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica

Reproducción de artículos: Se autoriza la fotocopia de artículos para fines académicos citando la fuente.

Acceso en línea: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica

Indexada: ISI (Web of Science), SCOPUS, SciELO, Redalyc, Qualis (CAPES), Dialnet, DOAJ (Directory of Open Journal Access), e-Revistas, Publindex (Colciencias), entre otros. | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 / Impresión: Image Impresores, Colombia, 100 ejemplares, Julio de 2015

Acta Agronómica Journal

Mission: Mission: Acta Agronomica Journal, edited quarterly by National University of Colombia, campus Palmira, publishes scientific papers in Spanish and English, in Agricultural Sciences, Agroindustry, Environment and related areas, resulting of research of authors associated to education and research institutions from different countries. Reviews are written and published by the journal Editorial Board or editor in chief invitation. Opinions are of exclusive responsibility of the authors.

Documents and correspondence can be send to: actaagronomica_pal@unal.edu.co.

Document preparation: an abbreviated guide is published in this edition. To access Authors Instructions complete guide, go to the website www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica

Article reproduction or copy: Copies with academic aims are authorized with source citation.

On line access: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Indexed in: ISI (Web of Science), SCOPUS, SciELO, Redalyc, Qualis (CAPES), Dialnet, DOAJ (Directory of Open Journal Access), e-Revistas, Publindex (Colciencias), among others. | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 / Printed 100 copies by Image Impresores, Cali, Colombia, July 2015.

Revista Acta Agronómica

Missao: a revista Acta Agronómica, editada trimestralmente pela Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, publica artigos científicos resultados de pesquisas em Castelhana e Inglês, nos âmbitos das Ciências Agrárias, Agroindustriais, Ambientais e outras áreas afins, de autores associados a entidades de educação e de pesquisa de países em geral. Os artigos de revisão são escritos por solicitação do Comitê Editorial ou do(a) editor (a) chefe da revista. As opiniões são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Documentos e correspondências: actaagronomica_pal@unal.edu.co.

Preparação de documentos: Nesta edição, ou no site web www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica se pode acessar o guia abreviado para a redação dos documentos, "Instruções para os Autores", e as instruções do OJS (Open Journal System).

Produção ou cópias: Estão autorizadas fotocópias dos artigos para fins acadêmicos, citando a fonte. A aceitação de publicidade não implica aprovação nem o respaldo dos respectivos produtos ou serviços por Acta Agronómica, nem pela Universidad Nacional de Colombia.

Acesso em linha: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Indexada em: ISI (Web of Science), SCOPUS, SciELO, Redalyc, Qualis (CAPES), Dialnet, DOAJ (Directory of Open Journal Access), E-Revistas, Publindex (Colciencias), entre outros. | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 / Impressos 100 exemplares por Image Impresores, Cali, Colombia, julho de 2015.

Comité Técnico / Technical Board



Coordinadora editorial
Corrección de estilo:
Supervisión:
Diseño y diagramación:
Administrador web:

Selene Alarcón Vasquez
Juan Alberto Ramírez Pérez
Arnulfo Gómez Carabalí
Alexander Pereira Mosquera
José Ranieri Correa Cárdenas

Créditos fotografía:
Nota:

Claudia Lorena Narváez Marmolejo, profesional de Comunicaciones de AGROSAVIA. Fotografía de fruto de mora Castilla sin espinas. Imagen tomada en la finca "El Tesorito", vereda Venecia, Trujillo - Valle del Cauca.

Diseño de portada:

D.I. Alexander Pereira Mosquera / apereiram@gmail.com

Guía abreviada para preparación de documentos / Brief guide for document preparation

Guía abreviada para preparación de documentos

Tipos y características de los documentos: Los trabajos sometidos a publicación no podrán someterse a otra revista mientras dure el proceso de revisión. Los errores de ortografía y la omisión de normas de presentación de documentos según la política editorial de Acta Agronómica son causales de rechazo.

Artículo científico: Presenta los resultados de investigación científica basada en hipótesis teórica o experimental, que signifique un aporte original al conocimiento. Relata la manera de delimitar la pregunta de investigación, el camino para someterla a prueba (análisis estadístico del experimento, protocolos disciplinarios) y la confrontación de los datos generados con la literatura actual. El rango aceptable para la configuración del documento es de 3500 hasta de 5000 palabras y hasta 20 referencias bibliográficas, incluyendo títulos (en el idioma original y en inglés), resumen (hasta 250 palabras), palabras clave, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y referencias bibliográficas.

Artículo de revisión: Será enviado a la revista únicamente por invitación directa del comité editorial o editora jefe de Acta Agronómica. Contiene el resultado de trayectorias dedicadas a la investigación o temas de frontera en las áreas de interés de la revista. Los límites máximos del documento son 10.000 palabras y hasta 80 referencias bibliográficas, incluyendo título (idioma original e inglés), resumen, abstract, introducción, capítulos, subcapítulos y referencias bibliográficas.

Preparación y formato del documento:

- Software Microsoft Office Word (Documento de Word 97-2003). Fuente Bookman Old Style, 14 para títulos, 12 para texto.
- Ajuste del documento al tamaño de papel carta (21.5 x 27.9 cm) y márgenes de 2.5 cm.
- Digite a doble espacio a través de todo el texto (incluyendo tablas y figuras).
- Palabras claves y key words deben ir ordenadas alfabéticamente. No repetir palabras del título.
- Únicamente usar la designación de Tabla y Figura (2000 x 1200 px, resolución 300 dpi, formato jpg, png)
- Los agradecimientos son opcionales y pueden contener máximo 30 palabras
- Para las referencias bibliográficas usar el estilo de la *American Psychological Association* (APA). No utilizar referencias como tesis, folletos, cartillas, resúmenes de congresos o eventos científicos.
- La revista adopta el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Envío de documentos: El envío de documentos es responsabilidad del autor para correspondencia y se realiza exclusivamente a través de la plataforma *Open Journal System*, página web de Ac Ag, http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Brief guide for document preparation

Types and characteristics of documents: The papers submitted to publication may not submit to another journal while the review process. Spelling errors and omission of document presentation rules according to the Acta Agronomica editorial policy are grounds of non- acceptance.

Scientific article: Presents the results of science research based in theoretical or experimental hypothesis that means an original contribution to knowledge. Describe the way to delimit the research question, the road to carry out the evaluation (the experiment statistical analysis, disciplinary protocols) and the data confrontation generated with the current literature. The configuration document acceptable range is from 3500 words to 5000 words and until twenty (20) bibliographic references, including titles (in original language and English title), abstract (250 words), key words, introduction, materials and methods, results and discussion and bibliographic references.

Review article: Will be submit to the journal only by direct invitation of the Acta Agronomica editorial board or chief editor. Contains the result of the dedicated paths to the research or border issues in the areas of interest of the journal. The maximum limits of the document are 10.000 words and 80 bibliographic references including title (original language and English title), abstract, key words introduction, chapters, bychapters and bibliographic references.

Document preparation and format:

- Software Microsoft Office Word (Word document 97-2003). Bookman Old Style, 14 for titles, 12 for text.
- Set document to letter size paper (21.5 x 27.9 cm) and 2.5 cm margins.
- Type double-spaced throughout the text (including tables and figures).
- Key words must be order alphabetically, do not repeat any title words.
- Use Table and Figure designation (2000 to 1200 px, resolution 300 dpi, format jpg, png).
- Acknowledgments are optional and can contain up to 30 words.
- For the bibliographic references, use the American Psychological Association (APA) style. No use references as thesis, pamphlets, brochures, summary congress and scientific events.
- The journal adopts the International System of Units (IS).

Article submission: Document submit is responsibility of the corresponding author and it is performed exclusively through the Open Journal System platform. Ac Ag website: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica.

Contenido / Content

Pag.

Optimización del proceso de liofilización y comparación con el secado por convección de estragón ruso (<i>Artemisia dracunculus</i> L.). Optimization of the process of freeze-drying and comparison with convective drying of Russian tarragon (<i>Artemisia dracunculus</i> L.). <i>Juliana Ramírez, Misael Cortés y Carlos A. Hincapié.</i>	167
Physical-chemical properties of exotic and native Brazilian fruits Propiedades físicoquímicas de frutas exóticas nativas de Brasil <i>Veridiana Zocoler de Mendonça and Rogério Lopes Vieites</i>	175
Variabilidad climática y disponibilidad hídrica en los valles de Ubaté, Chiquinquirá y Alto Chicamocha, Colombia Climatic variability and water availability of the Ubaté and Chiquinquirá valleys and Alto Chicamocha, Colombia <i>Alexandra Estefanía Fajardo Rojas</i>	182
Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Monstera acuminata</i> Koch y <i>Monstera deliciosa</i> Liebm <i>In vitro</i> establishment of <i>Monstera acuminata</i> Koch and <i>Monstera deliciosa</i> Liebm <i>Nancy Mariel Casanova Palomeque, Vincenzo Bertolini, Leobardo Iracheta Donjuan</i>	196
Economic evaluation of puberty induction of nulliparous Nelore heifers using intravaginal device and melengestrol acetate Evaluación económica de la inducción de la pubertad de novillas nulpáras de la raza Nelore con el uso de dispositivo intravaginal y acetato de melengestrol <i>Luiz Carlos Pereira, Renan de Souza Ferreira, Rony Fujii Gonçalves, Luís Carlos Vinhas Ítavo, Endyara Signor Kohl, Alexandre Menezes Dias, Marcos Barbosa Ferreira, Cristiano Marcelo Espínola Carvalho, Rodrigo Gonçalves Mateus</i>	205
Yield and popping expansion components in local popcorn varieties from Southern Brazil Componentes de rendimiento y capacidad de expansión de variedades locales de maíz pira en el sur de Brasil <i>Gabriel Moreno Bernardo Gonçalves, Luana Burg Mayer, Rosenilda de Souza, Juliana Bernardi Ogliari</i>	213
Chemical profile of the volatiles of <i>Baccharis salicifolia</i> (Asteraceae) and interaction with <i>Macrodactylus nigripes</i> (Coleoptera: Melolonthidae) Perfil químico de volátiles de <i>Baccharis salicifolia</i> (Asteraceae) e interacción con <i>Macrodactylus nigripes</i> (Coleoptera: Melolonthidae) <i>Ericka Nieves-Silva, Angel A. Romero-López</i>	222
Fertilización con nitrógeno, fósforo, potasio y calcio en mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth.): Efecto sobre Antracnosis bajo condiciones controladas Fertilization with nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in blackberry (<i>Rubus glaucus</i> Benth.): Effect on Anthracnose under controlled conditions <i>Luis Gabriel Bautista-Montealegre, Martha Marina Bolaños-Benavides, Jorge Humberto Argüelles-Cárdenas, Gerhard Fischer</i>	228
Electrochemical quantification of chlorpyrifos in white (<i>Allium cepa</i> L.) and green (<i>Allium fistulosum</i> L.) onions Cuantificación voltamétrica de clorpirifos en cebolla de bulbo (<i>Allium cepa</i> L.) y cebolla de rama (<i>Allium fistulosum</i> L.) <i>José Mauricio García Colmenares, Leidy Paola Páez Cepeda, Sandra Patricia Chaparro Acuña</i>	237
Incidencia de las condiciones de clima en el desarrollo y producción de semillas de <i>Salvia hispanica</i> L. Weather conditions incidence on development and production of <i>Salvia hispanica</i> L. seeds <i>Héctor Abel Busilacchi, Carolina Noelia Coronel, Mirian Susana Bueno, Mirian del Pilar Gonzalez, Diego Raúl Müller, Mirta Quiroga, Cecilia Rosa Severin</i>	244

Código QR sitio web



Optimización del proceso de liofilización y comparación con el secado por convección de estragón ruso (*Artemisia dracunculus* L.).

Optimization of the process of freeze-drying and comparison with convective drying of Russian tarragon (*Artemisia dracunculus* L.).

Juliana Ramírez^{1*}, Misael Cortés² y Carlos A. Hincapié³.

1. Tecnología en Gestión de Servicios Gastronómicos. Facultad Administración de Empresas Turísticas. Institución universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Medellín. Colombia. 2. Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. Grupo de investigación en Alimentos Funcionales (GAF). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Medellín. Colombia. mcortesro@unal.edu.co. 3. Grupo de investigaciones Agroindustriales (GRAIN). Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Pontificia Bolivariana Sede Medellín. Medellín. Colombia. carlos.hincapie@upb.edu.co, *Autor de correspondencia: juliana.ramirez@colmayor.edu.co.

Rec.: 2018-10-02 Acep.: 2019-06-27

Resumen

La deshidratación es un proceso de conservación que puede afectar negativamente las características nutritivas y organolépticas del producto tratado. El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de control de calidad de los alimentos, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, con el objetivo de optimizar el proceso de liofilización (LIO) de hojas de estragón ruso (*Artemisia drancunculus* L.) para conservar, de la mejor forma posible, sus características. Se utilizó un liofilizador de bandejas, donde el material vegetal fue enfriado desde 25 °C hasta -40 °C, a una velocidad de 0.22 °C/min. La optimización se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta con un diseño optimal, en función de la variable independiente velocidades de calentamiento de la placa (0.03 – 0.06 °C/min) desde -40 °C hasta 35 °C, manteniendo la temperatura de la placa durante 1 h a 35 °C. Las variables dependientes fueron: contenido de humedad, actividad de agua (a_w), actividad antioxidante, color y tiempo de secado. El producto deshidratado a la condición óptima se comparó con el obtenido por secado mediante el método de convección forzada (SC). El tiempo de proceso de Liofilización (LIO) presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al factor velocidad de calentamiento de placa (VCP). La condición óptima de LIO se obtuvo a una VCP de 0.06 °C/min durante 20.8 h. Los productos deshidratados por ambos métodos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en a_w , humedad final, DPPH, y color, pero no en el contenido de fenoles totales. Los productos LIO presentaron mejores propiedades que los productos SC, conservando de mejor manera su coloración y su actividad antioxidante con respecto a la planta en fresco.

Palabras clave: Aditivos alimentarios, antioxidantes, condimentos, deshidratación, plantas aromáticas, velocidad de secado, liofilización, secado por convección forzada.

Abstract

Drying is a conservation process that may adversely affect the nutritional and organoleptic properties of the product. The present study was developed in the Laboratory of food quality control, at the Universidad Nacional de Colombia, Medellín headquarters. The aim of this work was the experimental optimization of the freeze-drying process (LIO) of the Russian tarragon leaves (*Artemisia drancunculus* L.) to preserve, in the best possible way, its properties. We used a tray freeze dryer, where the material was frozen from 25 °C to -40 °C, at a speed of 0.22 °C/min. The optimization was carried out using response surface methodology with an optimal design, as a function of independent variable plate heating rates (0.03 – 0.06 °C/min) from -40 °C to 35 °C, holding the temperature of the plate at 35°C for one hour. The dependent variables were moisture content, water activity (a_w), antioxidant activity, color and drying time. The product dried in the optimum condition was compared with another drying by forced convection (SC). The freeze-drying time process presented statistically significant differences with the plate heating speed (VCP). LIO Optimal condition was obtained at a VCP of 0.06 °C/min for 20.8 hours. The dried products with both methods showing showed statistically significant differences in a_w , moisture, DPPH, and color, but not in total phenol content. The LIO products showed better properties than SC products, preserving, in a best way, its color and antioxidant activity in comparison to fresh plant.

Key words: Antioxidants, aromatic plants, condiments, drying, food additives, drying speed, lyophilization, drying by forced convection.

Introducción

Las plantas medicinales son una importante fuente de nuevas drogas e ingredientes para la industria alimentaria. Además, en los países en desarrollo son una fuente de cuidado primario para una parte importante de la población. El incremento de la demanda de medicamentos de origen vegetal y de metabolitos secundarios para uso medicinal, cosmético e industrial ha causado que el mercado de plantas medicinales haya aumentado de manera importante en los últimos años en todo el mundo (Chen et al., 2016) and they are disappearing at a high speed. This article reviews global trends, developments and prospects for the strategies and methodologies concerning the conservation and sustainable use of medicinal plant resources to provide a reliable reference for the conservation and sustainable use of medicinal plants. We emphasized that both conservation strategies (e.g. in situ and ex situ conservation and cultivation practices

El estragón (*Artemisia drancunculus* L.) es una planta aromática, condimentaria y medicinal que tiene dos variedades, estragón francés y estragón ruso, con el que se trabajó en este estudio. Esta planta se comercializa en fresco, congelada y deshidratada, siendo esta última la preferida por el mercado (Arabhosseini, Padhye, Huisman, van Boxtel, y Müller, 2011). A nivel industrial, el estragón se ha utilizado en la preparación de diferentes productos alimentarios y el extracto etanólico de las hojas puede ser útil para disminuir la incidencia de las enfermedades (Durić, Kovač-Bešović, Nikšić, y Sofić, 2013). Algunas investigaciones sugieren que el extracto de estragón podría emplearse como base para la preparación de medicinas debido a la buena capacidad antioxidante que posee (Miron, Plaza, Bahrim, Ibáñez, and Herrero, 2011).

Los procesos de deshidratación representan una de las alternativas de mayor uso para la generación de valor agregado en estos productos, imprimiéndoles una mayor conservación al reducir su actividad de agua, lo cual permite estabilizar sus propiedades y composición de los principios activos. El sistema más habitual de secado de plantas aromáticas es por convección natural o forzada de aire (SC), pero se pierden características como sabor y aroma, por esta razón existen otros sistemas industriales más sofisticados como la liofilización. Es así, como se han realizado comparaciones en productos liofilizados (LIO) y SC en diversos alimentos donde se han encontrado beneficios de la LIO como proceso de secado (Ratti, 2013).

El objetivo del presente estudio fue optimizar experimentalmente el proceso de liofilización de las hojas de estragón ruso (*A. drancunculus*) con fines de

uso como materia prima en los sectores de alimentos, farmacéutico y cosmético, o como infusión.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las hojas de *A. drancunculus* fueron recolectadas en mayo, agosto y septiembre de 2013, en la finca La Legumbrera, vereda Chipre (6° 09' 12' N, 75° 22' 27' O, a 2080 m.s.n.m.), Rionegro, Antioquia (Colombia). Para conservar sus propiedades, las hojas fueron almacenadas a 4 °C, durante un periodo máximo de 5 días.

Optimización del proceso de liofilización

Descripción del equipo. El proceso se realizó en un liofilizador Labconco Freezone 12- 7754040 con cámara de bandejas (Labconco Corporation, Kansas City, USA) equipado con unidad de congelación y secado, y acoplado a una bomba rotatoria de vacío (195 L/min), generando una presión de vacío de 0.14 mbar.

Proceso de liofilización. El material vegetal fue enfriado desde 25 °C hasta -40 °C, a una velocidad de 0.22 °C/min. El proceso de liofilización se optimizó utilizando la metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental Optimal, donde el número de repeticiones obedece al algoritmo matemático que emplea el método para modelar condiciones óptimas, así como economizar dinero, disminuir el tiempo y el número de las mismas (Huertas-García, Gázquez-Abad, Martínez-López, y Esteban-Millat, 2013) en función unifactorial de la velocidad de calentamiento de la placa (0.03 – 0.06 °C/min) como se especifica en la Tabla 1. La velocidad de calentamiento de la placa se establece para cada experimento desde el sistema de control del equipo. Las variables dependientes fueron: humedad, actividad de agua, actividad antioxidante (DPPH y polifenoles totales) y color. Los resultados fueron analizados mediante el Software Design Expert® 8.0 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA). Después de encontrar las condiciones óptimas de proceso, se procedió a realizar la liofilización usando esas mismas variables para comparar los valores arrojados por el modelo con datos experimentales.

Tabla 1. Diseño experimental para las condiciones óptimas de liofilización de *A. drancunculus*.

Ensayo	T _i (°C)	T _f (°C)	Tiempo de sostenimiento (h)	VCP (°C/min)	Tiempo de proceso (h)	Número de repeticiones
1	-40	35	1	0.03	42.6	3
2	-40	35	1	0.04	32.2	5
3	-40	35	1	0.05	26	2
4	-40	35	1	0.06	20.8	3

T_i = Temperatura inicial. T_f = Temperatura final.

Comparación de la liofilización vs. el secado por convección forzada

Las muestras obtenidas durante la liofilización en las condiciones óptimas se compararon con muestras obtenidas por secado por convección forzada (SC) usando un diseño completamente al azar con tres repeticiones para cada tipo de secado. El proceso de SC se realizó a 45 °C, velocidad de aire de 0.6 m/s, durante 22.8 h, condiciones apropiadas según Arabhosseini et al (2011). La comparación de ambos procesos se realizó a través de un ANOVA unifactorial y la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa) para verificar la existencia de las diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion® XV (Statpoint Technologies, Inc. The Plains, USA).

Caracterización química y física. Esta caracterización se realizó tanto para la muestra fresca como para las muestras obtenidas en cada experimento de deshidratación por liofilización y por secado por convección forzada.

Humedad. Se determinó bajo el método oficial de la AOAC (AOAC, 2005)

Actividad de agua (a_w). Se determinó con un higrómetro de punto de rocío a 25 °C (Aqualab serie 3TE, Decagon, Devices, Pullman, WA, USA)

Actividad antioxidante. Para la preparación del extracto se utilizó la metodología de Yeray Rodríguez et al. (2012) modificada, empleando agitación por ultrasonido (Briars y Paniwnyk, 2013). Para ello, 1 g de muestra triturada (molino de impacto de cizalla, tamiz 2mm) fue sometida a extracción acuosa (3 veces) bajo agitación en sonicador (Branson 3510) por 30 min a temperatura ambiente y sin luz, luego centrifugada a 3000 r.p.m. durante 5 min. El filtrado total se ajustó a un volumen de 100 mL.

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C) (Hincapié, Monsalve, Seigler, Alarcón, y Céspedes, 2011). Se diluyó el extracto de la solución madre a una concentración en la cual el contenido de fenoles se ajustó al intervalo de la curva patrón. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por gramo de muestra (mg AG/g)

La actividad atrapadora del radical libre DPPH fue cuantificada midiendo el grado de decoloración de una disolución metanólica de DPPH (20 mg/L), a una longitud de onda de 517 nm. El ensayo se llevó a cabo utilizando 10 µL de solución madre. Los resultados se expresan como miligramos de equivalentes trolox por gramo de muestra (mg TE/g).

Color. Para esta característica se utilizaron las hojas frescas enteras, tanto por el haz como por el envés. Las hojas secas, debido a su fragilidad, fueron trituradas. Para la medición, ambos tipos de muestra fueron cargadas en el accesorio X-Rite SP62-802 del equipo. El color se determinó a partir de los espectros de reflexión, obteniéndose las coordenadas: $CIE-L^*a^*b^*$ y $CIE-L^*C^*h^*$, empleando un espectrofotómetro de esfera X-Rite, modelo SP64, con iluminante D_{65} y un observador de 10° como referencia (Zuluaga et al., 2010). El componente L^* corresponde a la luminosidad del color y varía de 0 a 100, siendo cero el negro y 100 el blanco; a^* y b^* son los componentes cromáticos y sus valores varían desde -120 a 120. Para a^* los valores de menor a mayor corresponden a verde hasta el rojo y para b^* los valores de menor a mayor van desde el azul hasta el amarillo (Ibraheem, Hasan, Khan, y Mishra, 2012).

Resultados

Propiedades químicas y físicas de hojas frescas de *A. dracunculus*

En la Tabla 2 se observan los valores promedio más las desviaciones estándar de las propiedades químicas y físicas de las hojas de estragón ruso frescas.

Tabla 2. Valores promedio \pm D.E. de las propiedades químicas y físicas de las hojas de estragón ruso frescas.

Variable	Promedio \pm DS (n = 3)	
Humedad	87.8 \pm 0.0	
a_w	0.986 \pm 0.003	
L^*	Haz	35.7 \pm 1.2
	Envés	44.5 \pm 1.3
σ^*	Haz	-7.5 \pm 2.4
	Envés	-8.3 \pm 0.3
b^*	Haz	12.6 \pm 1.5
	Envés	16.9 \pm 1.6
C^*	Haz	14.8 \pm 1.8
	Envés	18.8 \pm 1.6
h^*	Haz	120.5 \pm 9.0
	Envés	116.4 \pm 1.4
Fenoles (mg AG/g)	32.4 \pm 0.8	
DPPH (mg TE/g)	30.8 \pm 0.4	

L^* = luminosidad del color. σ^* y b^* son los componentes cromáticos. a^* = coordenadas rojo/verde (+: rojo, -: verde). b^* = coordenadas amarillo/azul (+: amarillo, -: azul). C^* = color. h^* = matiz. mg AG/g = miligramos de ácido gálico por gramo de muestra. mg TE/g = miligramos de equivalentes Trolox por gramo de muestra.

Optimización del proceso de liofilización

En la Tabla 3 aparecen los valores promedio y las desviaciones estándar de las variables dependientes consideradas en el diseño experimental del proceso LIO de *A. drancunculus*, en función de la VCP; y en la Tabla 4 los resultados del ANOVA de la optimización del proceso LIO. Las muestras LIO no presentaron significancia estadística ($P > 0.05$) en contenido de humedad, a_w , L^* , a^* , b^* , C^* y h^* con respecto al factor VCP, pero sí ($P < 0.05$) en el tiempo de secado con respecto a dicho factor y a su interacción cuadrática. El tiempo de secado representa una variable de respuesta de importancia en los procesos LIO, ya que influye directamente en los costos de producción, debido al gasto energético que implica (Lopez-Quiroga, Antelo, y Alonso, 2012).

Para el rango utilizado en este estudio, la mayor VCP usada fue la más favorable al minimizar el tiempo de LIO. El modelo cuadrático del tiempo de secado presentó un efecto negativo con el factor VCP y un efecto positivo con su interacción cuadrática (Ecuación 1).

$$\text{Tiempo de secado}(\text{min}) = 29.49 - 10.09 * A + 1.62 * A^2 \quad \text{Ec. 1}$$

La optimización del proceso, minimizando el tiempo de liofilización y conservando los rangos de los atributos de calidad (Tabla 5), indicó una VCP 0.06 °C/min, lo que permitió fijar el tiempo de proceso en 21.8 h, con una deseabilidad de 0.996. La deseabilidad evalúa la forma cómo la configuración de los factores estudiados optimiza las variables de respuesta, mientras más cercano este el valor a 1 más ideal es el modelo (Del Castillo, Montgomery, y McCarville, 1996).

Tabla 4. ANOVA para los modelos de respuesta de la optimización del proceso de liofilización de *A. drancunculus*.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significancia (*P≤)
Tiempo (h)	697.79	2	348.9	133.45	0.0001
Humedad (%)	3.27E-04	2	1.63E-04	1.21	0.340
a_w	9.70E-03	2	4.85E-03	1.21	0.339
Fenoles (mg AG/g)	642.68	2	321.34	1.58	0.253
DPPH (mg TE/g)	503.40	2	251.70	1.27	0.322
L^*	14.90	2	7.45	2.22	0.159
a^*	0.23	2	0.11	0.21	0.850
b^*	2.45	2	1.22	0.51	0.614
C^*	21.74	5	4.35	3.67	0.060
h^*	9.75	3	3.25	1.86	0.206

L^* = luminosidad del color. a^* y b^* son los componentes cromáticos. a^* = coordenadas rojo/verde (+: rojo, -: verde). b^* = coordenadas amarillo/azul (+: amarillo, -: azul). C^* = color. h^* = matiz. mg AG/g = miligramos de ácido gálico por gramo de muestra. mg TE/g = miligramos de equivalentes Trolox por gramo de muestra.

Comparación entre liofilización vs. secado por convección

En la Tabla 6 se incluyen los resultados de la comparación entre los métodos de deshidratación por liofilización y por convección, y en la Tabla 7 los valores promedio y las desviaciones estándar de los atributos de calidad (variables respuesta) de las hojas deshidratadas de *A. drancunculus* por LIO en las condiciones óptimas y por secado mediante convección (SC). Se presentaron diferencias ($P < 0.05$) entre ambos procesos para las variables humedad, a_w , DPPH, L^* , a^* , C^* , h^* y la cromaticidad b^* , lo que no se observó para el contenido de fenoles totales.

Tabla 3. Resultados del proceso de liofilización de a diferentes velocidades de calentamiento de *A. drancunculus*.

Ens. (no.)	VCP °C/min	T. (h)	Hum. (%)	a_w	Fenoles (mg AG/g)	DPPH (mg TE/g)	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*
1	0.06	20.8	6.4±0.3	0.359±0.016	93.3±2.2	47.8±2.0	37.9±3.2	-7.2±0.2	19.0±0.7	20.3±0.7	110.7±0.2
2	0.03	42.6	4.6±0.6	0.409±0.006	74.3±4.6	59.9±7.3	37.9±2.2	-6.5±0.7	17.6±2.8	18.8±2.9	110.5±1.0
3	0.05	26.0	5.6±0.1	0.205±0.003	73.3±2.6	53.6±7.5	35.3±0.8	-4.8±0.2	14.1±0.4	14.9±0.5	108.6±0.3
4	0.05	26.0	7.4±0.4	0.299±0.003	89.7±0.6	40.9±0.5	38.3±0.3	-5.6±0.2	14.6±0.3	15.6±0.3	111.2±0.6
5	0.04	32.2	6.7±0.2	0.253±0.004	95.8±1.4	37.6±0.5	36.2±1.4	-5.1±0.6	13.9±0.4	14.8±0.5	110.3±2.1
6	0.04	32.2	3.5±0.3	0.245±0.004	58.4±0.6	19.1±1.9	38.3±1.3	-6.5±0.1	17.1±0.2	18.3±0.2	110.7±0.5
7	0.04	32.2	4.9±0.2	0.238±0.008	84.6±3.7	49.8±0.2	39.6±0.4	-6.9±0.2	16.3±0.9	17.7±0.9	112.9±0.7
8	0.04	32.2	5.7±0.5	0.236±0.000	62.0±1.5	72.4±0.6	38.8±2.2	-6.6±0.3	14.8±1.5	16.2±1.5	114.2±1.1
9	0.03	42.6	4.2±0.1	0.185±0.003	87.4±2.4	63.9±1.3	35.2±0.6	-5.6±0.2	15.7±1.0	16.7±1.0	109.8±0.8
10	0.04	32.2	4.5±0.2	0.196±0.003	82.9±1.7	61.2±0.6	36.0±4.6	-6.1±1.3	15.9±3.4	17.0±3.6	111.0±0.5
11	0.06	20.8	6.0±0.6	0.255±0.006	79.8±2.4	47.0±1.8	32.4±1.9	-6.0±0.3	15.8±1.4	16.9±1.4	110.9±1.0
12	0.03	42.6	6.7±0.2	0.242±0.010	109.6±9.6	68.4±1.3	37.5±1.2	-5.6±0.1	15.1±0.2	16.1±0.2	110.3±0.5
13	0.06	20.8	6.8±0.0	0.302±0.001	92.2±2.2	58.8±2.5	34.8±1.3	-6.1±0.2	14.6±1.1	15.9±1.1	112.7±1.0

L^* = luminosidad del color. a^* y b^* son los componentes cromáticos. a^* = coordenadas rojo/verde (+: rojo, -: verde). b^* = coordenadas amarillo/azul (+: amarillo, -: azul). C^* = color. h^* = matiz. mg AG/g = miligramos de ácido gálico por gramo de muestra. mg TE/g = miligramos de equivalentes Trolox por gramo de muestra.

Tabla 5. Resultados experimentales y predichos de las variables de respuesta en hojas de estragón ruso (*A. dracunculus*) liofilizadas a la condición óptima (VCP = 0.06 °C/min).

Variable	Experimental	Predicción
Tiempo de secado (horas)	21.017	21.8 ± 1.681
Humedad (%)	0.06409 ± 0.003	0.0645 ± 0.012
a_w	0.30544 ± 0.005	0.304 ± 0.063
Fenoles totales (mg AG/g)	93.5184 ± 1.8074	94.307 ± 4.249
DPPH (mg TE/g)	57.7790 ± 0.8670	54.826 ± 4.063
L^*	36.7037 ± 1.697	35.033 ± 1.832
a^*	-6.4355 ± 0.646	-6.261 ± 0.742
b^*	16.4794 ± 1.697	16.287 ± 1.547
C^*	18.00 ± 2.00	18.3329 ± 1.09
h^*	107.403 ± 0.129	111.592 ± 1.32

L^* = luminosidad del color. a^* y b^* son los componentes cromáticos. a^* = coordenadas rojo/verde (+: rojo, -: verde). b^* = coordenadas amarillo/azul (+: amarillo, -: azul). C^* = color. h^* = matiz. mg AG/g = miligramos de ácido gálico por gramo de muestra. mg TE/g = miligramos de equivalentes Trolox por gramo de muestra.

Tabla 6. Resultados del ANOVA de los Atributos de calidad de hojas de *A. dracunculus* deshidratados por LIO y SC

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significancia (*P≤)
Humedad (%)	1.6	1	1.6	15.21	0.02
a_w	0.009	1	0.009	698.3	0.00
Fenoles	1.5	1	1.5	1.3	0.32
DPPH	445.7	1	445.7	41.1	0.00
L^*	15.6	1	15.6	8.2	0.04
a^*	4.1	1	4.1	16.5	0.01
b^*	5.2	1	5.1	21.1	0.01
C^*	3.9	1	3.9	42.2	0.00
h^*	24.5	1	24.5	43.2	0.00

L^* = luminosidad del color. a^* y b^* son los componentes cromáticos. a^* = coordenadas rojo/verde (+: rojo, -: verde). b^* = coordenadas amarillo/azul (+: amarillo, -: azul). C^* = color. h^* = matiz.

Tabla 7. Atributos de calidad para cada uno de los procesos de secado de estragón ruso (*A. dracunculus*).

Variable	Proceso de sacado		P < 0.05
	Liofilización	Convectivo	
Humedad final	0,06409 ± 0,003	0,05400 ± 0,0826	**
a_w	0,30544 ± 0,005	0,38130 ± 0,0029	**
Fenoles (mg AG/g)	93,5184 ± 1,8074	92,5282 ± 0,8123	NS
DPPH (mg TE/g)	57,7790 ± 0,8670	40,5418 ± 2,5551	**
L^*	36,7037 ± 1,697	32,4811 ± 0,2289	**
a^*	-6,4355 ± 0,646	-4,7911 ± 0,2740	**
b^*	16,4794 ± 1,697	14,6244 ± 0,3541	NS
h^*	107,403 ± 0,129	110,7330 ± 0,2390	**
C^*	17,6914 ± 1,8158	15,3892 ± 0,4477	**

L^* = luminosidad del color. a^* y b^* son los componentes cromáticos. a^* = coordenadas rojo/verde (+: rojo, -: verde). b^* = coordenadas amarillo/azul (+: amarillo, -: azul). C^* = color. h^* = matiz.

Discusión

Propiedades químicas y físicas de hojas frescas de *A. dracunculus*

Como era de esperar, se observó que la actividad del agua a_w de la planta fresca (ver Tabla 2) favorece el crecimiento de microorganismos. Los resultados de color para las hojas frescas permitieron identificar que el haz tiende a ser más oscuro, con mayor cromaticidad amarilla, menor saturación y un tono o matiz más verdoso, que el envés. No obstante, la cromaticidad verdosa no presentó diferencias ($P > 0.05$) entre ambos lados de la hoja.

Optimización del proceso de liofilización

El proceso de secado a valores altos de VCP permite obtener niveles de humedad, aproximadamente, entre el 6 y 7%, lo cual representa un valor inferior a las condiciones exigidas por las normas de exportación (< 8%) de la European Spice Association (ESA), una organización que engloba a la industria europea de especias (ESA, 2018). Cuando la VCP fue alta, los valores de a_w se incluyen en el rango entre 0.25 y 0.36, lo cual garantiza una seguridad microbiológica del producto obtenido con *A. drancunculus* en estado fresco, cuya a_w fue 0.986 ± 0.003 lo que favorece la reducción de reacciones de deterioro de los atributos de calidad (Kaya y Kahyaoglu, 2007)25 and 35°C over a water activity (a_w). También se encontró que la VCP no influyó en los parámetros relacionados con el color ya que no se presentaron diferencias significativas entre ellos. El proceso de optimización experimental de secado por liofilización permitió alcanzar los atributos de calidad deseados a bajos tiempos de LIO.

Comparación entre liofilización vs. secado por convección

Porcentaje de humedad y a_w . Con ambos métodos se obtuvieron porcentajes de humedad inferiores a 8%, lo que permite la comercialización del producto resultante. A pesar de que se logró un menor porcentaje de humedad con el secado por convección, es necesario resaltar el hecho que con la liofilización se alcanzó una menor actividad de agua. Esto evidencia una ventaja de la LIO como método de conservación de estragón ruso. Es importante anotar que las condiciones de sensibilidad que puede presentar el producto al ataque de microorganismos y demás aspectos relacionados con la a_w , le confieren una fuerza motriz alta en el proceso de transferencia de masa con el entorno y por tanto, si el almacenamiento del producto LIO no es adecuado, puede ocurrir un incremento de humedad que altera la matriz hacia cambios en el estado amorfo vítreo en que se

encuentra, pasando a un estado gomoso, donde se aceleran los procesos de deterioro del producto, con la consecuente pérdida de muchos de sus atributos de calidad (Arabhosseini, Huisman, Van Boxtel, y Müller, 2005) *Artemisia dracunculus* L. (stem and leaf separately; en consecuencia, se deben garantizar las acciones de manejo necesarias para evitar la rehidratación del producto final.

Actividad antioxidante. La ausencia de significancia entre el contenido de polifenoles totales, indican que las condiciones de temperaturas empleadas en ambos métodos de secado fueron las adecuadas para conservar la estabilidad de los compuestos. No obstante, con la prueba DPPH se encontró mayor actividad antioxidante ($P < 0.05$) en el producto deshidratado por LIO vs. el obtenido por SC. Esta diferencia de resultados se explica porque, no toda la actividad antioxidante es ejercida por compuestos polifenólicos (Hincapié et al., 2011) y el secado por convección pudo degradar algunos de esos compuestos presentes en la planta (Gonçalves, Pinheiro, Abreu, Brandão, y Silva, 2007). Igualmente es posible que algunos compuestos son fácilmente oxidables y por tanto reaccionan con el reactivo F-C (Meda, Lamien, Romito, Millogo, y Nacoulma, 2005).

Los contenidos de fenoles obtenidos en el presente estudio con ambos tipos de deshidratación (93.5184 ± 1.8074 mg AG/g para LIO y 92.5282 ± 0.8123 mg AG/g para SC) fueron mayores que los encontrados en otros estudios con aceites esenciales (24.10 mg AG/g) por Behbahani, Shahidi, Yazdi, Mortazavi, y Mohebbi (2017). Durić et al. (2013) en extracto acuoso obtenido a $90 - 95^\circ\text{C}$ a partir de hojas de *A. dracunculus* encontraron un contenido de fenoles totales de 35.186 ± 1.896 mg AG/g, el cual es inferior al encontrado en este trabajo.

Los contenidos de polifenoles en *A. drancunculus* liofilizado le confieren al producto propiedades antioxidantes, que podrían estar relacionadas con su alto contenido de vitamina C, un poderoso agente reductor (Aglarova et al., 2008). En otras especies vegetales se ha encontrado que la liofilización es el método más indicado para conservar la vitamina C en el producto final (Shitanda y Wanjala, 2006). Durić et al. (2013) en extracto acuoso de hojas de *A. dracunculus* encontraron como principales fenoles los ácidos gálicos (0.18 mg/g), sinápico (0.73 mg/g), cafeico (7.31 mg/g) y clorogénico ($1,41$ mg/g). A partir de la misma muestra extraída en caliente los autores, usando DPPH, encontraron una IC_{50} de 0.766 mg/ml. En este caso se registró mayor capacidad antioxidante en el extracto acuoso que en el aceite esencial. Para otras especies de artemisia (*A. annua* L., *A. arborescens* (Vaill.) L., *A. ludoviciana* Nutt, *A. oleandica* (Besser) Krasch., *A. princeps*

Pamp. y *A. stelleriana* Bess) se encontró que los fenoles dominantes eran ácidos hidroxibenzoicos (ácido ferúlico y cafeico como los más dominantes) e hidroxicinnámicos (principalmente ácido gálico), flavonoles y catequinas (Carvalho, Cavaco, y Brodelius, 2011).

Existen numerosas evidencias que muestran la mejor conservación de los polifenoles y de la actividad antioxidante en diferentes matrices vegetales cuando se deshidrata usando liofilización vs. el secado por convección forzada. Entre ellas, los estudios realizados con muscadina (*Vitis rotundifolia* Michx.) (Vashisth, Singh, y Pegg, 2011) vacuum belt drying (VBD, cascara de granada (*Punica granatum* L.) (Marchi et al., 2015) y frutas de madroño (*Arbutus unedo* L.) (Orak et al., 2012). Se ha encontrado que la pérdida de los polifenoles en los métodos de secado por convección forzada, no solo obedece a la exposición de la matriz a largos tiempos de proceso a altas temperaturas, sino también a la actividad de la polifenol oxidasa, al contenido de ácido orgánico, a la concentración de azúcar o al pH (Vashisth et al., 2011).

La capacidad antioxidante de los extractos de estragón ruso, usando los métodos de F-C y DPPH, en el presente estudio fueron superiores a los obtenidos por Durić et al., (2013) usando la misma especie de planta cosechada en Sarajevo (Bosnia y Herzegovina). Este potencial podría ser útil en la industria alimentaria, farmacéutica e industrias de cosmetología. Existe entonces la necesidad de realizar experimentos de fraccionamiento para evaluar los compuestos activos individualmente.

Color. El efecto del tipo de proceso, LIO o SC, presentó diferencias ($P < 0.05$) en el parámetro luminosidad (L^*), lo que indica que las muestras LIO son más claras que las SC, y sugiere que esta condición puede atribuirse a la forma de vidrio altamente poroso que presenta la estructura LIO permitiendo el paso de la luz y, por otro lado, al colapso microestructural de la matriz SC (contracción volumétrica) (Orrego Alzate, 2008). El parámetro a^* , que va desde colores verdes a rojos, muestra que las hojas LIO son significativamente más verdes que las FC. Comparando las características de color de las muestras deshidratadas por ambos métodos con respecto al producto fresco (Tablas 2 y 7) se observa que la liofilización permite conservar valores más cercanos a la planta fresca que el secado por convección en los valores de L^* y a^* , lo que significa que la luminosidad y la tonalidad verde son similares entre LIO y la hoja fresca, tanto por el haz como por el envés, en comparación con FC que tiende a ser más oscuro y menos verde. Estos cambios de color posiblemente son debidos a la degradación de carotenoides (Gonçalves et al., 2007) o a la degradación de la clorofila por

las altas temperaturas (Arabhosseini et al., 2011), lo cual es seguido por pardeamiento enzimático, provocado por la interacción de la enzima polifenol oxidasa con el oxígeno y los polifenoles presentes, generando un oscurecimiento (Argyropoulos y Müller, 2014; Zuluaga, Rodríguez, y Rodríguez-Sandoval, 2010). Se encontraron valores similares para el parámetro b^* en ambos tipos de secado y para la hoja fresca por ambos lados. Es importante aclarar que aunque el ANOVA mostró diferencias ($P < 0.05$) en esta variable entre las muestras obtenidas a partir de ambos tipos de secado, en la prueba estas diferencias no se encontraron, a pesar de que dicha prueba declara como significativas diferencias muy pequeñas (Gutiérrez Pulido y De La Vara Salazar, 2012).

Conclusiones

Las velocidades de calentamiento de placa (VCP) durante el proceso LIO, evaluadas en esta investigación, no afectaron las propiedades físicoquímicas y color de las hojas de estragón ruso, por el contrario, el tiempo fue la variable de respuesta más representativa.

El método de secado LIO presentó características favorables como menor deterioro de color, menor a_w , similar contenido fenólico y superior capacidad antioxidante, cuando se compara con el método de secado por convección.

El estragón ruso cultivado en el oriente antioqueño (Colombia) presentó mejores características de actividad de agua, capacidad antioxidante y color en comparación con las estudiadas en otras regiones tropicales y templadas.

Referencias

- Aglarova, A. M.; Zilfikarov, I. N.; y Severtseva, O. V. 2008. Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.) (review. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(2), 81–86. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0064-3>
- AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. W. Horwitz, Ed.) (18th ed.. AOAC International.
- Arabhosseini, A.; Huisman, W.; Van Bostel, A.; y Müller, J. 2005. Modeling of the Equilibrium Moisture Content (EMC) of Tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.. *International Journal of Food Engineering*, 1(5), art 7. Retrieved from <http://www.bepress.com/ijfe>
- Arabhosseini, A.; Padhye, S.; Huisman, W.; van Bostel, A.; y Müller, J. 2011. Effect of Drying on the Color of Tarragon (*Artemisia dracunculoides* L.) Leaves. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1281–1287. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0305-9>
- Argyropoulos, D.; y Müller, J. 2014. Kinetics of change in colour and rosmarinic acid equivalents during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), e15–e22. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2013.12.001>
- Behbahani, B. A.; Shahidi, F.; Yazdi, F. T.; Mortazavi, S. A.; y Mohebbi, M. 2017. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculoides*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 847–863. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9456-3>
- Briars, R.; y Paniwnyk, L. 2013. Effect of ultrasound on the extraction of artemisinin from *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products*, 42, 595–600. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.06.043>
- Carvalho, I. S.; Cavaco, T.; y Brodelius, M. 2011. Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.005>
- Chen, S.-L.; Yu, H.; Luo, H.-M.; Wu, Q.; Li, C.-F.; y Steinmetz, A. 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine*, 11(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7>
- Del Castillo, E.; Montgomery, D. C.; y McCarville, D. R. 1996. Modified Desirability Functions for Multiple Response Optimization. *Journal of Quality Technology*, 28(3), 337–345. <https://doi.org/10.1080/00224065.1996.11979684>
- Durić, K.; Kovač-Bešović, E.; Nikšić, H.; y Sofić, E. 2013. Antioxidant activity of water extracts and essential oil of *Artemisia dracunculoides* L., Asteraceae. *Medicinski Žurnal*, 19(2), 94–99. Retrieved from <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=6e944728-51b7-4910-aaf2-be728fbad843%40pdc-v-sessmgr01>
- ESA. 2018. European Spice Association *Quality Minima Document*. Retrieved from <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/publications-esa>
- Gonçalves, E. M.; Pinheiro, J.; Abreu, M.; Brandão, T. R. S.; y Silva, C. L. M. 2007. Modelling the kinetics of peroxidase inactivation, colour and texture changes of pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) during blanching. *Journal of Food Engineering*, 81(4), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.011>
- Gutiérrez Pulido, H.; y De La Vara Salazar, R. 2012. *Análisis y Diseño de experimentos* (Tercera ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Hincapié, C. A.; Monsalve, Z.; Seigler, D. S.; Alarcón, J.; y Céspedes, C. L. 2011. Antioxidant activity of *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett., *Curcuma domestica* Valetton and *Tagetes verticillata* Lag. y Rodríguez. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(4), 315–324. Retrieved from http://www.blacpma.usach.cl/images/docs/010-004/005_hincapie.pdf
- Huertas-García, R.; Gázquez-Abad, J. C.; Martínez-López, F. J.; y Esteban-Millat, I. 2013. Using Response Surface Methodology to Optimise Factors

- in Conjoint Experiments. *International Journal of Market Research*, 55(2), 267–288. <https://doi.org/10.2501/IJMR-2013-023>
- Ibraheem, N. A.; Hasan, M. M.; Khan, R. Z.; y Mishra, P. K. 2012. *ARN Journal of Science and Technology*:: Understanding Color Models: A Review. *ARN Journal of Science and Technology*, 2(3), 265–275. Retrieved from <http://www.ejournalofscience.org>
- Kaya, S.; y Kahyaoglu, T. 2007. Moisture sorption and thermodynamic properties of safflower petals and tarragon. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 413–421. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.10.009>
- Lopez-Quiroga, E.; Antelo, L. T.; y Alonso, A. A. 2012. Time-scale modeling and optimal control of freeze-drying. *Journal of Food Engineering*, 111(4), 655–666. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.03.001>
- Marchi, L. B.; Monteiro, A. R.; Mikcha, J. M.; Santos, A. R.; Chinellato, M. M.; Marques, D. R.; ... Costa, S. C. 2015. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of pomegranate Peel Extract (*Punica Granatum* L.) under different drying temperatures. In *Chemical engineering transactions* (Vol. 44). <https://doi.org/10.3303/CET1544021>
- Meda, A.; Lamien, C. E.; Romito, M.; Millogo, J.; y Nacoulma, O. G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>
- Miron, T. L.; Plaza, M.; Bahrim, G.; Ibáñez, E.; y Herrero, M. 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4918–4927. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.055>
- Orak, H.; Aktas, T.; Yagar, H.; İsbilir, S. S.; Ekinçi, N.; y Sahin, F. H. 2012. Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L) fruit. *Food Science and Technology International*, 18(4), 391–402. <https://doi.org/10.1177/1082013211428213>
- Orrego Alzate, C. E. 2008. Congelación y liofilización de alimentos. Manizales, Caldas, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/7837/1/9789584444363.pdf>
- Ratti, C. 2013. *Freeze drying for food powder production*. In *Handbook of Food Powders* (pp. 57–84). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.1.57>
- Rodríguez, Y.; Sánchez-Catalán, F.; Rojano, B.; Durango, D.; Gil, J.; y Marín-Loaiza, J. 2012. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 15(2), 303–311. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000200007
- Shitanda, D.; y Wanjala, N. V. 2006. Effect of different drying methods on the quality of jute (*Corchorus olitorius* L.). *Drying Technology*, 24(1), 95–98. <https://doi.org/10.1080/07373930500538865>
- Vashisth, T.; Singh, R. K.; y Pegg, R. B. 2011. Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT - Food Science and Technology*, 44(7), 1649–1657. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2011.02.011>
- Zuluaga, J. D.; Rodríguez, M. C.; y Rodríguez-Sandoval, E. 2010. Evaluación de las características físicas de mango deshidratado aplicando secado por aire caliente y deshidratación osmótica. *Revista de La Facultad de Ingeniería U.C.V.*, 25(4), 127–135.

Physical-chemical properties of exotic and native Brazilian fruits

Propiedades físicoquímicas de frutas exóticas nativas de Brasil

Veridiana Zocoler de Mendonça* and Rogério Lopes Vieites

Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Botucatu, Brasil; Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Botucatu. *Author for correspondance: veridianazm@yahoo.com.br

Rec: 2016-02-28 Accept: 2019-04-09

Abstract

Many fruit species are still not well-studied, despite being rich in bioactive substances that have functional properties. The objective of this article was to evaluate the antioxidant potential and characterize the physical-chemical characteristics of unconventional brazilian fruits (cabeludinha - *Myrciaria glazioviana*, sapoti - *Manilkara zapota*, pitomba - *Talisia esculenta*, yellow gumixama - *Eugenia brasiliensis* var. *Leucocarpus* and seriguela - *Spondias purpurea*). Total soluble solids, pH, titratable acidity, sugars, pigments, phenolic compounds and antioxidant capacity were measured. Mature fruits were used in the analyses. Pitomba had high levels of soluble solids, 24.6 °Brix, while sapoti had 0.05 g malic acid 100 g⁻¹ pulp. Yellow grumixama and seriguela had the highest concentrations of anthocyanins and carotenoids. Cabeludinha had a high concentration of phenolic compounds, 451.60 mg gallic acid 100 g⁻¹ pulp. With the exception of sapoti, all fruits had a high antioxidant capacity (> 95%).

Key words: *Eugenia brasiliensis*, *Manilkara zapota*, *Myrciaria glazioviana*, *Spondias purpurea*, *Talisia esculenta*.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial antioxidante y caracterizar las propiedades físicoquímicas de frutas exóticas en Brasil (cabeludinha - *Myrciaria glazioviana*, sapoti - *Manilkara zapota*, pitomba - *Talisia esculenta*, gumixama amarilla - *Eugenia brasiliensis* var. *Leucocarpus* y seriguela - *Spondias purpurea*). Para el efecto se realizaron análisis de sólidos solubles, pH, acidez titulable, azúcares, pigmentos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Los frutos fueron cosechados en estado de madurez fisiológica y para los análisis se utilizaron las partes comestibles de la fruta. Los frutos presentaron elevado contenido de sólidos solubles y baja acidez titulable, sobresalieron la pitomba con 24.6 °Brix y sapoti con 0.05 g de ácido málico 100 g⁻¹ pulpa. Grumixama amarilla y seriguela presentaron mayor contenido de antocianinas y carotenoides. Cabeludinha presentó elevado contenido de compuestos fenólicos, en promedio de 451.60 mg ácido gálico por 100 g de pulpa. Con excepción de sapoti, todas las frutas mostraron elevada actividad antioxidante (> 95%).

Palabras clave: *Eugenia brasiliensis*, *Manilkara zapota*, *Myrciaria glazioviana*, *Spondias purpurea*, *Talisia esculenta*.

Introduction

The consumption of fruits is increasing in recent years due to their functional properties. They contain bioactive substances that have antioxidant activities and beneficial effects, despite being present at low concentrations (Kaur and Kapoor, 2002, Mélo et al., 2008, Carvalho et al., 2016).

The native Brazilian Mata Atlântica fruits cabeludinha (*Myrciaria glazioviana*), yellow grumixama (*Eugenia brasiliensis* var. *Leucocarpus*) and pitomba (*Talisia esculenta*) are poorly-studied species (Rocha et al., 2011) and their consumption is mostly restricted to their points of origin. At the same time, exotic species in Central America, sapoti (*Manilkara zapota*) and seriguela (*Spondias purpurea*) are cultivated in northern and northeastern parts of Brazil, but seldom elsewhere. However, such species may have antioxidant potential.

According Lorenzi et al. (2006) and Martins et al. (2002) cabeludinha (*Myrciaria glazioviana* – Myrtaceae Family) has a globose shape, the peel is thick, hairy and yellow. It contains one or two seeds that correspond to almost 50% of the fruit mass, the pulp is translucent-juicy and acidulated. Yellow grumixama tree (*Eugenia brasiliensis* var. *Leucocarpus* - Myrtaceae Family) has globular fruit, smooth and bright yellow peel, juicy and sweet pulp and contain one to three seeds. Pitomba fruits (*Talisia esculenta* – Sapindaceae Family) are subglobous, hard and rough with yellow or ferruginous color, contains one or two seeds covered by fine and translucent aril, acidulated taste. Sapoti fruit (*Manilkara zapota* – Sapotaceae Family) is rounded or ellipsoid, has sweet pulp, with four to ten seeds. Seriguela tree (*Spondias purpurea* – Anacardeacea Family) has fruits with oblonga-ellipsoid shape, smooth, brilliant and red purple color peel, with sweet acidulated pulp.

The fruits are main dietary sources of polyphenols with antioxidant activities and have variable composition of its phytochemical constituents (Mélo et al., 2008). Information on the physical-chemical characteristics and the functional value of native fruits are basic tools to encourage the consumption and the formulation of new products, since the knowledge of these characteristics will enable a better indication of their consumption and use in the food industry (Rocha et al., 2013). Besides, the information about the phytochemical contents contributes to add commercial and industrial value to the fruits (Alves et al., 2017). However, few data are available in the literature regarding the physicochemical composition of these fruits,

highlighting the need for scientific research on the subject.

Given the importance of research on natural antioxidants and the scarcity of data related of Brazilian native fruits (Alves et al., 2017). The objective of this work was to characterize the physical-chemical properties and evaluate antioxidant potential in vitro of cabeludinha (*Myrciaria glazioviana*):yellow grumixama (*Eugenia brasiliensis* var. *Leucocarpus*) pitomba (*Talisia esculenta*),sapoti (*Manilkara zapota*) and seriguela (*Spondias purpurea*).

Material and methods

Mature fruits were collected at the Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP in Botucatu, São Paulo (22° 53' 09" latitude south, 48° 26' 42" longitude west and 804 m altitude) and immediately subjected to laboratory tests. For cabeludinha (*M. glazioviana*) pitomba (*T. esculenta*) and sapoti (*M. zapota*) pulp was used for analysis and the fruits were manually peeled with knife help. For yellow grumixama (*E. brasiliensis* var. *Leucocarpus*) and seriguela (*S. purpurea*) pulp and peel was analyzed. Each sample was homogenized by mixer for a total of 200 g.

Physical-chemical analyses

The methodology of Instituto Adolfo Lutz (2008) was used: the levels of soluble solids (SS) were determined at 25 °C using an ABBE refractometer (model Atago-N1) and expressed as °Brix; the pH of the sliced and homogenized samples was determined using a digital DMPH-2 pH meter; the titratable acidity (AT) of 5 g of homogenized samples, diluted to 100 mL with distilled water, was determined using a 0.01 N solution of sodium hydroxide, the results were expressed as g (citric or malic) acid per 100 g of sample.

Reducing and total sugars

To determine total and reducing sugars, the method of Nelson (1944) modified by Somogyi (1945) was used. A Micronal B382 spectrophotometer was used to read the absorbance at 535 nm and the results were expressed as a percentage.

Pigments

The determination of the level of pigments was done by the method of Sims and Gamon (2002) using a UV/VIS spectrophotometer and measuring absorbances at 663 nm (chlorophyll A), 647 nm (chlorophyll B), 537 nm (anthocyanin) and 470 nm (carotenoids). The absorbance values were converted to $\mu\text{g g}^{-1}$ pulp.

Determination of solvents for phenolic compounds and antioxidant capacity

Three solvent mixtures were tested: 80% ethanol + 20% distilled water, 80% metanol + 20% distilled water and 80% acetone + 20% distilled water. The concentration of phenolic compounds was done colorimetrically using the Folin-Ciocalteu reagent as described by Singleton et al. (1999). This method involves the reduction of the reagent by phenolic compounds and concomitant formation of a complex that absorbs light at 760 nm. Gallic acid was used as the standard. Results were expressed as mg gallic acid equivalents 100 g⁻¹ fresh sample (GAE).

The *in vitro* antioxidant capacity was determined using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as described by Mensor et al. (2001). The antioxidants in samples react with DPPH which is a stable free radical. It is converted to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine. The degree of decolorization indicates the antioxidant potential of the extract. The absorbance at 517 nm was measured. Results were expressed as percentage DPPH reduced, according to equation 1.

$$\% \text{ DPPH Reduced} = ((Abs_{Control} - Abs_{Sample}) / Abs_{Control}) * 100$$

Eq. 1

where, $Abs_{Control}$ is the absorbance of the DPPH solution and Abs_{Sample} is the absorbance of the sample.

Data analysis

Four repetitions of the physical-chemical analyses, sugars and pigments were done, average results are presented. The determination of phenolic compounds and antioxidant activities were done in triplicate for each repetition. An ANOVA, F and Tukey tests for average comparison were done.

Results and discussion

Physical-chemical analysis

Pitomba, a species native to Brazil, had 24.60 °Brix SS, which was higher than the others (Table 1). Yellow grumixama had the highest titratable acidity, 1.33 g acid 100 g⁻¹ pulp. Sapoti had the lowest titratable acidity. The pH values ranged from 3.06 for yellow grumixama to 3.66 for cabeludinha, with the exception of sapoti, which had a pH of 5.08.

Table 1. Soluble solids, pH and titratable acidity of unconventional Brazilian fruits. Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP in Botucatu, São Paulo

Fruit	Physical-Chemical*		
	Soluble solids (°Brix)	pH	Titratable acidity* (g acid 100 g ⁻¹ pulp)
Cabeludinha	15.90±0.32	3.66±0.09	0.22±0.01
Sapoti	16.68±0.10	5.08±0.19	0.05±0.01
Pitomba	24.60±0.63	3.40±0.09	1.05±0.12
Yellow grumixama	15.63±1.70	3.06±0.13	1.33±0.09
Seriguela	15.07±0.64	3.12±0.04	0.74±0.08

*Cabeludinha, yellow grumixama and seriguela: titratable acidity expressed as g citric acid 100 g⁻¹ pulp. Sapoti and pitomba: acidity expressed as g malic acid 100 g⁻¹ pulp. Average ± standard deviation.

Lira Jr. et al. (2010) when evaluating seriguela clones from the germoplasm bank of Itambé-PE/Brazil, found SS values from 16.47 to 23.87 °Brix and titratable acidity from 0.73 to 1.15%. Ramírez-Hernández et al. (2008) found that wild mexican seriguela had 7.0 to 10.8 °Brix SS, while cultivated seriguela had 8 to 15.6 °Brix SS, with a tendency to increase under ideal climactic conditions. The levels of SS found in the present study were consistent with the literature cited.

Research on sapoti done by Morais et al. (2006) found 0.2 to 0.25% malic acid total titratable acidity after being stored 12 days and a pH ranging from 5 to 6, which conforms with those found in the present study. The pH depends on the concentration of free H⁺ ions, while SS depends on the sugar content of the fruit.

Total and reducing sugars

Sapoti and yellow grumixama had the highest values of reducing sugars, 13.04 and 16.68%, respectively. Total sugars and sucrose were not obtained (Table 2), while cabeludinha, pitomba and seriguela had reducing sugars, total sugars and sucrose, with more in pitomba and seriguela compared to cabeludinha that had only 0.82%.

Table 2. Total and reducing sugars, as well as saccharose (sucrose) of unconventional Brazilian fruits. Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP in Botucatu, São Paulo.

Fruit	Sugars (%)		
	Reducing sugars	Total sugars	Sucrose
Cabeludinha	8.10±0.42	8.97±1.78	0.82±1.90
Sapoti	13.04±1.35	*—	*—
Pitomba	9.27±0.31	14.93±1.17	5.38±1.29
Yellow grumixama	16.68±1.09	*—	*—
Seriguela	5.21±0.28	10.14±0.15	4.68±0.20

*—: Absence of total sugars and sucrose. Average ± standard deviation.

Maldonado-Astudillo et al. (2014) reported total sugar values ranging from 4.4 to 22.3% and for reducing sugars from 0.1 to 14.4% for seriguela. These differences are due to differences in climatic and geographic conditions. The present study found 5.21% and 10.14% for reducing and total sugars, respectively.

The levels of total and reducing sugars can be low at the initial stages of maturation, and increase gradually during ripening (Maldonado-Astudillo et al., 2014). In fruits with a high level of sugar, like sapoti, there is a high correlation between the increase in soluble sugars and soluble solids (Alves et al., 2000). This is verified in the present study, with values of 16.68 °Brix and 13.04% of reducing sugars. The amount of sugars in sapoti increases during maturation. This is provided by the degradation of amides and hemicellulose, as well as degrading the latex of the fruits, due to the actions of microorganisms or latex enzymes (Pathak and Bhat, 1952).

Pigments

Yellow grumixama had 74.03 and 65.62 $\mu\text{g g}^{-1}$ pulp chlorophylls A and B, respectively, as well as anthocyanins 473.56 $\mu\text{g g}^{-1}$. This anthocyanins level is 2.5 higher than seriguela with 185.71 $\mu\text{g g}^{-1}$ pulp (Table 3). Seriguela had the highest value of carotenoids, 185.83 $\mu\text{g g}^{-1}$ pulp, average between the values obtained by Vargas et al. (2017) in ripe seriguela fruits (143.8 and 853.6 $\mu\text{g g}^{-1}$). It should be noted that yellow grumixama and seriguela are consumed with the peels. So, the pulp along with the peels of the fruits probably contribute to the high levels of pigments.

Carotenoids, besides being pigments, have several functions such as vitamin A activity, cancer prevention, cardiovascular protection and the ability to reduce the risks of cataracts (Chirinos et al., 2010). So, seriguela is noteworthy due to its high concentration of carotenoids.

Determination of solvents for phenolic compounds

80% acetone was the most effective for sapoti, pitomba and seriguela (Table 4). For yellow grumixama and cabeludinha the three different solvents performed similarly ($P < 0.05$). Note that cabeludinha had a high level of phenolic compounds, in average 451.60 mg gallic acid 100 g^{-1} fresh weight.

Table 4. Evaluation of extraction solvents for phenolic compounds in unconventional Brazilian fruits. Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP in Botucatu, São Paulo.

Fruit	Total Phenolic Compounds (mg gallic acid 100 g^{-1} fresh weight)			CV
	Ethanol 80%	Methanol 80%	Acetone 80%	
Cabeludinha	412.15 a*	502.83 a	439.83 a	20.60
Sapoti	16.51 b	13.88 b	23.67 a	11.06
Pitomba	105.95 b	100.18 b	191.41 a	23.19
Yellow grumixama	168.51 a	192.02 a	183.72 a	14.71
Seriguela	95.95 b	95.83 b	185.85 a	13.31

*Averages followed by the same letter in lines don't differ significantly by the Tukey test ($P < 0.05$). CV (%): coefficient of variation.

Table 3. Levels of chlorophyll A, chlorophyll B, anthocyanins and carotenoids of unconventional Brazilian fruits. Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP in Botucatu, São Paulo.

Fruit	Pigments ($\mu\text{g g}^{-1}$ pulp)			
	Chlorophyll A	Chlorophyll B	Anthocyanins	Carotenoids
Cabeludinha	10.61±2.49	13.14±3.32	64.87±5.19	67.78±8.70
Sapoti	54.95±22.78	30.58±15.83	38.78±11.59	23.56±10.87
Pitomba	8.33±2.26	13.22±2.65	57.51±17.67	13.77±5.25
Yellow grumixama	74.03±31.35	65.62±39.07	473.56±160.96	185.83±36.98
Seriguela	11.64±6.64	12.22±12.07	185.71±36.70	275.31±53.51

Average ± standard deviation.

According to Vasco et al. (2008) fresh fruit species can be classified as low (< 100 mg GAE/100 g), medium (100 to 500 mg GAE/100 g) or high (> 500 mg GAE/100 g). According to this classification, sapoti and seriguela have low levels of phenolic compounds, yellow grumixama and pitomba are intermediate and Cabeludinha has high content.

Roesler et al. (2007) studied the in vitro antioxidant activities of fruits from the do Cerrado (*Annona crassiflora*, *Solanum lycocarpum*, *Eugenia dysenterica*, *Caryocar brasiliense* and *Swartzia langsdorffii*) and verified that water did not extract as many phenolic compounds as ethanol and that ethanol and that the concentration was higher in the seeds and peels. Although cabeludinha's peels were not analyzed in the present study, the pulp had a high concentration of phenolic compounds.

The camu-camu (*Myrciaria dubia*) is known to be an important source of antioxidants, such as vitamin C, beta-carotene and phenolic compounds (Vidigal et al., 2011). Total phenolic content obtained by Tietbohl et al. (2017) in *Myrciaria floribunda* fruits was 0.23 g GAE g⁻¹. Cabeludinha is in the same family (Myrtaceae) and genus (*Myrciaria*) of this fruits. Based on the results of the current study, it also has a high potential to become a good source of antioxidants with beneficial characteristics for consumers.

Silva et al. (2018) studied uvaia fruits (*Eugenia pyriformis*) and obtained values between 402.69 and 483.25 mg GAE 100 g⁻¹ for phenolic compounds. While in the present study, yellow grumixama (*Eugenia brasiliensis* var. *Leucocarpus*), a plant of the same genus and family, values between 168.51 and 192.02 GAE 100 g⁻¹ were observed.

In sapoti fruits, phenolic compounds are important for astringency. During maturation, this change due to the polymerization of these compounds and this decreases their concentrations (Lakshminarayana e Subramanyam, 1966, Taira et al., 1997). Thus, the reduction in the concentrations of tannins tend to reduce the total phenolics (Abe et al., 2011). This can explain the low levels found in the current study (from 13.88 to 23.67 mg gallic acid 100 g⁻¹ fresh weight).

Determination of solvent for antioxidant capacity

Sapoti had the lowest in vitro antioxidant capacity, 21.54%. It was not affected by the solvent chosen (Table 5). For cabeludinha, 80% ethanol and 80% methanol, did not differ statistically. Similar results were obtained with yellow grumixama. In contrast, 80% methanol and 80% acetone were best for pitomba. For seriguela 80% acetone was best.

According Alezandroa et al. (2013) lower levels of phenolic compounds and consequently, lower antioxidant capacity were observed in mature jabuticaba fruit (Myrtaceae family and native Brazilian specie) pulps. The seeds had high in vitro antioxidant capacities, followed by the peel and the pulp, regardless of the method used (Folin-Ciocalteu, or DPPH). This can be explained by the fact that some compounds undergo modifications in ripe fruits due to enzyme activities, such as the hydrolysis of glycosides by glycosidases, the oxidation of phenolic compounds by phenol oxidases and the polymerization of free phenols. Besides this, soluble phenolic compounds are present at

Table 5. Evaluation of extraction solvents for determining the antioxidant capacity using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) of unconventional Brazilian fruits. Faculdade de Ciências Agrônomicas/UNESP in Botucatu, São Paulo.

Species	Antioxidant capacity (% DPPH reduced)			CV
	Ethanol 80%	Methanol 80%	Acetone 80%	
Cabeludinha	94.71 ab*	95.89 a	93.25 b	0.77
Sapoti	19.93 a	28.88 a	15.80 a	15.30
Pitomba	70.66 b	95.58 a	96.80 a	10.15
Yellow grumixama	95.11 a	95.31 a	91.32 b	1.25
Seriguela	92.41 c	94.06 b	96.17 a	0.58

*Averages followed by the same letter in lines don't differ significantly by the Tukey test (P < 0.05). CV (%): coefficient of variation.

higher concentrations in the peel, compared to the pulp (Robards et al., 1999). This fact should be double-checked with sapoti, since it had lower antioxidant capacity. Neri-Numa et al. (2014) studied pitomba fruits. They suggested that they can be explored as a good source of antioxidants that can have anti-cancer properties. Engels et al. (2012) found 21 phenolic compounds using mass spectrometry. In the present study, high antioxidant capacity in pitomba (from 70.66 to 96.80%) and seriguela (from 92.41 to 96.17%) was evaluated.

By means of the obtained results, the fruits studied presented high antioxidant potential, being able to be rich sources of bioactive compounds in the feeding besides the possible stimulation of the consumption of native fruits, valorization of the species and diversification of the consumption of vegetables.

Conclusion

The fruits cabeludinha, pitomba, yellow grumixama and seriguela represent sources of phenolic compounds with important antioxidant capacity. Cabeludinha stands out from other fruits due to its relevant contents of phenolic compounds and yellow grumixama and seriguela due to its relevant contents anthocyanins and carotenoids.

References

- Abe, L. T.; Lajolo, F. M.; e Genovese, M. I. 2011. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, United Kingdom, 92(8):1679–1687. DOI 10.1002/jsfa.5531
- Alezandroa, M. R.; Dubé, P.; Desjardins, Y.; Lajolo, F. M.; e Genovese, M. I. 2013. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. *Food Research International*, United Kingdom, 54(1):468–477. DOI 10.1016/j.foodres.2013.07.018
- Alves, R. E.; Filgueiras, H. A. C.; e Moura, C. F. H. 2000. *Sapoti (Manilkara achras (Mill.) Fosberg)*. In: Alves, R. E.; Filgueiras, H. A. C.; e Moura, C. F. H. (coord.). *Caracterização de frutas nativas da América Latina* (Série Frutas nativas, 9): Jaboticabal: Funep 55–58.
- Alves, A. M.; Dias, T.; Hassimotto, N. M. A.; Naves, M. M. V. 2017. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. *Food Science and Technology*, Campinas, 7(4):564–569. DOI 10.1590/1678-457x.26716.
- Carvalho, D. N.; Horino, M.; McCarthy, W. J. 2016. Adult intake of minimally processed fruits and vegetables: associations with cardiometabolic disease risk factors. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, New York, 116(9):1387–1394. DOI 10.1016/j.jand.2016.03.019
- Chirinos, R.; Galarza, J.; Betalleguz-Pallardel, I.; Pedreschi, R.; e Campos, D. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, Netherlands, 120(4):1019–1024. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.11.041
- Engels, C.; Gräter, D.; Esquivel, P.; Jiménez, V. M.; Gänzlea, M. G.; e Schieber, A. 2012. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, United Kingdom, 46(2):557–562. DOI 10.1016/j.foodres.2011.04.003
- Instituto Adolfo Lutz. 2008. *Métodos físicos e químicos para análise de alimentos*, 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020p.
- Kaur, C.; e Kapoor, H. C. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, United Kingdom, 37(2):153–161. DOI 10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x
- Lakshminarayana, S.; e Subramanyam, H. 1966. Physical, chemical and physiological changes in sapota fruit (*Achras sapota* (Sapotaceae)) during development and ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, New Delhi, 3(1):151–153.
- Lira Júnior, J. S.; Bezerra, J. E. F.; Lederman, I. E.; e Moura, R. J. M. 2010. Produção e características físico-químicas de clones de ciriguela na Zona da Mata Norte de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife, 5(1):43–48. DOI 10.5039/agraria.v5i1a583
- Lorenzi, H.; Bacher, L.; Lacerda, M.; e Sartori, S. 2006. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640p.
- Maldonado-Astudilloa, Y. I.; Alia-Tejacal, I.; Núñez-Colín, C. A.; Jiménez-Hernández, J.; Pelayo-Zaldívar, C.; López-Martínez, V.; Andrade-Rodríguez, M.; Bautista-Baños, S.; e Valle-Guadarrama, S. 2014. Postharvest physiology and technology of *Spondias purpurea* L. and *S. mombin* L. *Scientia Horticulturae*, Netherlands, 174(1):193–206. DOI 10.1016/j.scienta.2014.05.016
- Martins, L.; Coutinho, E. L.; Panzani, C. R.; Xavier, N. J. D. 2002. *Fruteiras nativas do Brasil e exóticas*. Campinas: CATI, 112p.
- Mélo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; e Nascimento, R. J. 2008. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Recife, 44(2):193–201. DOI 10.1590/S1516-93322008000200005
- Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; Dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; e Leitão, S. G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical

- method. *Phytotherapy Research*, Chichester, 15(2):127–130. DOI 10.1002/ptr.687
- Morais, P. L. D.; Lima, L. C. O.; Alves, R. E.; Filgueiras, H. A. C.; e Almeida, A. S. 2006. Alterações físicas, fisiológicas e químicas durante o armazenamento de duas cultivares de sapoti. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41(4):549-554. DOI 10.1590/S0100-204X2006000400001
- Nelson, N. A. 1944. A photometric adaptation of a Somogy method for the determination of Glucose. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville, 153(1):375-L <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/?doi=10.1.1.453.9073&rep=rep1&type=pdf>
- Neri-Numa, I. A.; Carvalho-Silva, L. B.; Ferreira, J. E. M.; Machado, A. R. T.; Malta, L. G.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; e Pastore, G. M. 2014. Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*). *Food Science and Technology*, Campinas, 59(2):1233-1238. DOI 10.1016/j.lwt.2014.06.034
- Pathak, S.; e Bhat, J. V. 1952. Studies on the carbohydrate metabolism of *Achras zapota* L. fruit. *Journal of the University of Bombay*, London, 21(1):11-20.
- Ramirez-Hernández, B. C.; Pimienta-Barrios, E.; Castellanos-Ramos, J. Z.; Muñozurias, A.; Palomino-Hasbach, G.; e Pimienta-Barrios, E. 2008. Sistemas de producción de *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) en el centro-occidente de México. *Revista de Biología Tropical*, San José, 56(2):675–687. URL https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442008000200021
- Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; e Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, Netherlands, 66(4):401–436. DOI 10.1016/S0308-8146(99)00093-X
- Rocha, M. S.; Figueiredo, R. W.; Araújo, M. A. M.; Moreira-Araújo, R. S. R. 2013. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado Piauiense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 35(4):933-941. DOI 10.1590/S0100-29452013000400003
- Rocha, W. S.; Lopes, R. M.; Silva, D. B.; Vieira, R. F.; Silva, J. P.; e Agostini-Costa, T. S. 2011. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(4):1215-1221. DOI 10.1590/S0100-29452011000400021
- Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Sousa, C. A. S.; e Pastore, G. M. 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Science and Technology*, Campinas, 27(1):53-60. DOI 10.1590/S0101-20612007000100010
- Silva, A. P. G.; Tokairin, T. O.; Alencar, S. M.; Jacomino, A. P. 2018. Characteristics of the fruits of two uvaia populations grown in Salesópolis, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, Jaboticabal, 40(2):e-511. DOI 10.1590/0100-29452018511
- Sims, D. A.; e Gamon, J. A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, New York, 81(2-3):337-354. DOI 10.1016/S0034-4257(02)00010-X
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; e Lamuela, R. M. 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, San Diego, 299(1):152-178. DOI 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Somogyi, M. 1945. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, Rockville Pike, 160(1):69-73. URL <http://www.jbc.org/content/160/1/69.short>
- Taira, S.; Ono, M.; e Matsumoto, N. 1977. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology Technology*, Amsterdam, 12(3):265-271. DOI 10.1016/S0925-5214(97)00064-1
- Tietbohl, L. A. C.; Oliveira, A. P.; Esteves, R. S.; Albuquerque, R. D. D. G.; Folly, D.; Machado, F. P.; Corrêa, A. L.; Santos, M. G.; Ruiz, A. L. G.; Rocha, L. 2017. Antiproliferative activity in tumor cell lines, antioxidant capacity and total phenolic, flavonoid and tannin contents of *Myrciaria floribunda*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, 89(2):1111-1120. DOI 10.1590/0001-3765201720160461
- Vargas, A. S.; Juárez-López, P.; López-Martínez, V.; Flores, L. J. P.; Sánchez, D. G.; Alia-Tejagal, I. 2017. Antioxidant activity and physicochemical parameters in 'cuernavaqueña' mexican plum (*Spondias purpurea* L.) at different ripening stages. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 39(4)(e-787). DOI 10.1590/0100-29452017787
- Vasco, C.; Ruales, J.; e Kamal-Eldin, A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, Netherlands, 111(4):816-823. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.04.054
- Vidigal, M. C. T. R.; Minim, V. P. R.; Carvalho, N. B.; Milagres, M. P.; e Gonçalves, A. C. A. 2011. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açai (*Euterpe oleracea* Mart.): Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). *Food Research International*, United Kingdom, 44(7):1988–1996. DOI 10.1016/j.foodres.2010.11.028

Variabilidad climática y disponibilidad hídrica en los valles de Ubaté, Chiquinquirá y Alto Chicamocha, Colombia

Climatic variability and water availability of the Ubaté and Chiquinquirá valleys and Alto Chicamocha, Colombia

Alexandra Estefania Fajardo Rojas

Agrosavia, Cúcuta, Colombia. Autor para correspondencia: estefaniafajardorojas@gmail.com

Rec.: 2017-11-28 Acep.: 2019-07-03

Resumen

En este estudio se analiza la variabilidad climática de dos regiones de importancia agropecuaria en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca (Colombia). Se identifican comportamientos modales de variables climáticas de interés agropecuario, así mismo, se realiza el análisis intra-anual de eventos extremos y se identifican áreas con deficiencias y excesos hídricos a través de un balance hidrológico. Además, se identifican zonas con mayor frecuencia de condiciones de deficiencias y excesos hídricos en el suelo a escala mensual por medio del Índice de Severidad de Sequía de Palmer (PSDI). Los resultados indican que ambas zonas de estudio no muestran grandes diferencias climáticas entre sí, sin embargo, es importante realizar el estudio por separado con la intención de proporcionar información local de utilidad para los productores. Saboyá en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y Sotaquirá en el Alto Chicamocha son altamente afectados por eventos tanto de deficiencia como exceso hídrico. El evento El Niño 1997 tuvo un impacto más fuerte en el área del Valle de Ubaté y Chiquinquirá, mientras que en el Alto Chicamocha se registró la mayor reducción de la precipitación en 1992, lo que coincidió con un evento El Niño. En cuanto a excesos hídricos, 2011 registró aumentos superiores a 50% en la precipitación en las regiones del estudio, este comportamiento responde al evento La Niña registrado ese año.

Palabras clave: Recursos hídricos, agrometeorología, clima, precipitación atmosférica, variación estacional, balance hídrico, sequía, producción ganadera.

Abstract

This study analyzes the climatic variability of relevant agricultural regions in Boyacá and Cundinamarca. Modeling behaviors of climatic variables of agricultural interest are identified, likewise, the intra-annual analysis of extreme events is carried out and areas with water deficiencies and excesses are identified through a hydroclimatic balance. Finally, areas with greater frequency of deficiencies and water excess conditions in soil were identified on a monthly basis by index of the Palmer Drought Severity Index (PSDI). The results indicate that the two zones of study do not show great climatic differences between them, however, it is important to carry out separately study of them looking to provide local useful information for producers. Saboyá in the Ubaté Valley and Chiquinquirá and Sotaquirá in the Alto Chicamocha were affected by both, deficiency and excess, water events. The 1997 El Niño event had a stronger impact in the Ubaté Valley and Chiquinquirá area. Moreover, Alto Chicamocha region showed the biggest rainfall reduction registered in 1992, which matches with an El Niño event. In terms of excess water, 2011 perceived rainfall increases of more than 50% in those two regions, this behavior responded to La Niña event that year.

Keys words: Water resources, agrometeorology, climate, atmospheric fallout, seasonal variation, water balance, drought, livestock production.

Introducción

Como lo menciona Torres (2011) la ganadería es la actividad rural con mayor aporte a la economía del sector agropecuario del país y a su vez con mayor presencia en el espacio rural colombiano. En Colombia, los Valles de Ubaté y Chiquinquirá y Alto Chicamocha son importantes nichos de producción de leche ubicados en el altiplano Cundiboyacense (Corpoica, 2009).

Los sistemas productivos agropecuarios en este altiplano presentan una alta variabilidad frente a amenazas asociadas con la variabilidad climática intra e interanual, que según diversos estudios se ha intensificado en las últimas décadas (IPCC, 2014; CEPAL, 2015). La preocupación entre los productores es creciente y perciben una alta incertidumbre frente al comportamiento del clima (Corpoica, 2012). De acuerdo con Tapasco et al. (2015) y tomando en cuenta los escenarios más probables de cambio climático (IPCC, 2014), en las próximas décadas se presentaría una notoria disminución en la producción de leche y carne, siendo más grande el efecto sobre la primera.

El evento La Niña 2010-2011 (CPC, 2017) afectó 63.4% del área del Valle de Ubaté y Chiquinquirá y el 59% del área del Alto Chicamocha. El mayor impacto se presentó sobre las pasturas de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) (Corpoica, 2012), que constituyen 80% del recurso de alimentación ganadera en la región (Criollo et al., 2012).

Los impactos asociados con la variabilidad climática hacen evidente que el sistema ganadero es altamente vulnerable frente cambios climáticos. En este sentido, es necesario conocer las características de clima y evaluar la oferta hídrica integrando los ciclos interanuales como insumos para la selección y recomendación de alternativas de manejo que permitan disminuir el riesgo frente eventos climáticos extremos.

El objetivo del presente trabajo fue generar información climática de interés agropecuario presentando las condiciones de disponibilidad hídrica en los Valles de Ubaté y Chiquinquirá y Alto Chicamocha que sea de utilidad en la planificación de actividades productivas, de investigación y de capacitación tendientes a reducir la vulnerabilidad de los sistemas ganaderos de la región frente a la variabilidad climática.

Materiales y métodos

Área de estudio

El Valle de Ubaté y Chiquinquirá se encuentra ubicado entre los 5° 03' y los 5° 54' N y 73° 21' y los 72° 30' O, con un área aproximada de 218,600 ha y comprende los municipios de: Tausa,

Sutatausa, Carmen de Carupa, Cucunubá, Ubaté, Lenguazaque, Guachetá, Fúquene, Susa, Guasca, Villapinzón y Simijaca en Cundinamarca y San Miguel de Sema, Saboya, Caldas, Ráquira y Chiquinquirá en Boyacá.

El Valle del Alto Chicamocha tiene una extensión aproximada de 363,900 ha entre 4° 33' y los 5° 8' N y los 73° 35' O, comprende los municipios de: Samacá, Cucaita, Tunja, Sáchica, Chiquiza, Motavita, Combita, Oicatá, Sotaquirá, Tuta, Toca, Pesca, Tota, Cuitiva, Duitama, Firavitoba, Iza, Nobsa, Paipa, Santa Rosa de Viterbo, Sogamoso, Tibasosa, Corrales, Busbanzá, Floresta, Cerinza, Belén y Tutazá (Corpoica, 2009) (Figura 1.).

Información de clima

Se utilizó el catálogo oficial del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM, 2013) para identificar y seleccionar las estaciones climáticas ubicadas en el área de estudio. De acuerdo con los lineamientos de la Guía de prácticas climatológicas de la OMM (OMM, 2017), a partir de 1980 se trabajó con series históricas de 30 años de variables climáticas de impacto agropecuario, entre ellas: precipitación, temperatura del aire (temperatura máxima media, temperatura mínima media y temperatura media), humedad relativa y brillo solar.

Se seleccionaron series de tiempo con máximo 30% de datos faltantes para las diferentes variables. Sin embargo, siendo la temperatura una variable importante en el cálculo de la evapotranspiración del cultivo de referencia (ET_o), y debido a la limitada disponibilidad de estaciones con registros de esta variable, se aceptaron series de tiempo con 40% de datos faltantes.

El control de calidad de series climáticas fue realizado por el grupo de Agroclimatología de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria en un protocolo consensuado con el IDEAM que incluyó procesos de complementación de datos faltantes, tomando como referente a Vicent-Serrano et al. (2010), donde a través de planos de correlación-distancia (Guijarro, 2014) se agruparon las estaciones con comportamientos similares y en cada grupo se aplicó el test de Alexandersson (1986) para detectar heterogeneidades en las series, finalmente las series con heterogeneidades fueron rechazadas. Los datos faltantes se generaron utilizando el método de proporciones citado por Guijarro (2011) a partir de la interpolación espacial de las variables registradas en estaciones vecinas y teniendo en cuenta la distancia entre ellas. La validación del proceso de calidad se realizó mediante el test de McCuen

(McCuen, 1998) que compara las diferencias entre las medidas mensuales en las series de datos generados respecto a las originales.

Análisis de clima

Los diferentes análisis fueron realizados con el objetivo de identificar y caracterizar valores extremos y comportamientos normales de clima en series de 30 años para cada variable, de acuerdo con los lineamientos de la OMM (2017) para el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y la región del Alto Chicamocha. Así mismo se generaron gráficos y mapas para visualizar la distribución espacial y temporal de los fenómenos presentados y de esta forma argumentar el comportamiento climático local para la zona de estudio.

Precipitación. Se analizó la distribución espacial de los promedios anuales, el análisis del comportamiento intra-anual promedio por periodos agrícolas (trimestres) y la variación inter-anual (identificación de los años con valores climáticos extremos) para cada región. Adicionalmente se calcularon los porcentajes anuales de aumento y disminución de lluvias (anomalías anuales) para el periodo 1980 - 2011 (multianual) para identificar y caracterizar los valores extremos.

Para analizar alteraciones climáticas asociadas con eventos ENSO, se categorizaron las series de tiempo de cada variable como eventos El Niño y La Niña (CPC, 2017). Para cada evento se calcularon los promedios mensuales y se hicieron comparaciones entre sí para identificar la intensidad y duración media de las alteraciones.

Temperatura, humedad relativa y brillo solar. Se realizó un análisis general del comportamiento modal de estas variables climáticas identificando áreas con características particulares. La información de estas variables climáticas sirvieron como insumo para el cálculo de la evapotranspiración del cultivo de referencia (ET_o) a través de la metodología FAO Penman Monteith (Allen et al., 2006).

Balance hidroclimático. Para el cálculo de la ET_o se aplicó la metodología FAO Penman Monteith (Allen et al., 2006) y se utilizaron las series de datos climáticos de temperatura de aire, humedad relativa y brillo solar; los datos de viento se tomaron de la información nacional de esta variable (IDEAM, 2006).

Con la diferencia en volumen entre precipitación y ET_o se identificaron áreas donde se presentan condiciones de excesos o deficiencias hídricas por región. Los valores positivos indicaron condiciones de excesos y valores negativos condiciones de deficiencia.

Índice de Severidad de Sequía de Palmer (PSDI). A partir de códigos diseñados en lenguaje R, integrando variables de clima y de suelos (IGAC, 2000; IGAC, 2005) se calculó el PSDI a escala mensual en la serie de 30 años para cada estación climática. Posteriormente, para cada estación se realizó el conteo del número de meses con condiciones de sequía y con condiciones de humedad, comparando con el número de meses con condiciones cercanas a lo normal (Palmer, 1965). Las salidas se representaron cartográficamente a través de interpolaciones espaciales (Shepard, 1968) que permiten identificar áreas con alta, media o baja frecuencia de eventos de sequía y/o humedad en el suelo a escala mensual.

Resultados

Consolidación de la información climática

Una vez terminado el análisis de calidad de la información, se encontraron 82 estaciones con registros climáticos ubicadas en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y 108 en la región del Alto Chicamocha (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Número de estaciones IDEAM según categoría, por regiones en el estudio. Colombia.

Categoría de estación	Indicador	Valle de Ubaté y Chiquinquirá	Alto Chicamocha
Climatológica Ordinaria	CO	13	12
Climatológica principal	CP	7	8
Meteorológica Especial	ME	2	1
Pluviográfica	PG	19	18
Pluviométrica	PM	42	66
Agrometeorológica	AM	1	3
Total		82	108

El número de series dependió de la variable climática, fue así como algunas estaciones no registraron información de todas las variables, por tanto, se encontró que la variable precipitación contaba con 82 series en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá, mientras que en la región del Alto Chicamocha se identificaron 108 series de la variable. A diferencia de lo que ocurre con las variables de temperatura, donde el número disminuyó incluso a 8 series en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá (Tabla 2).

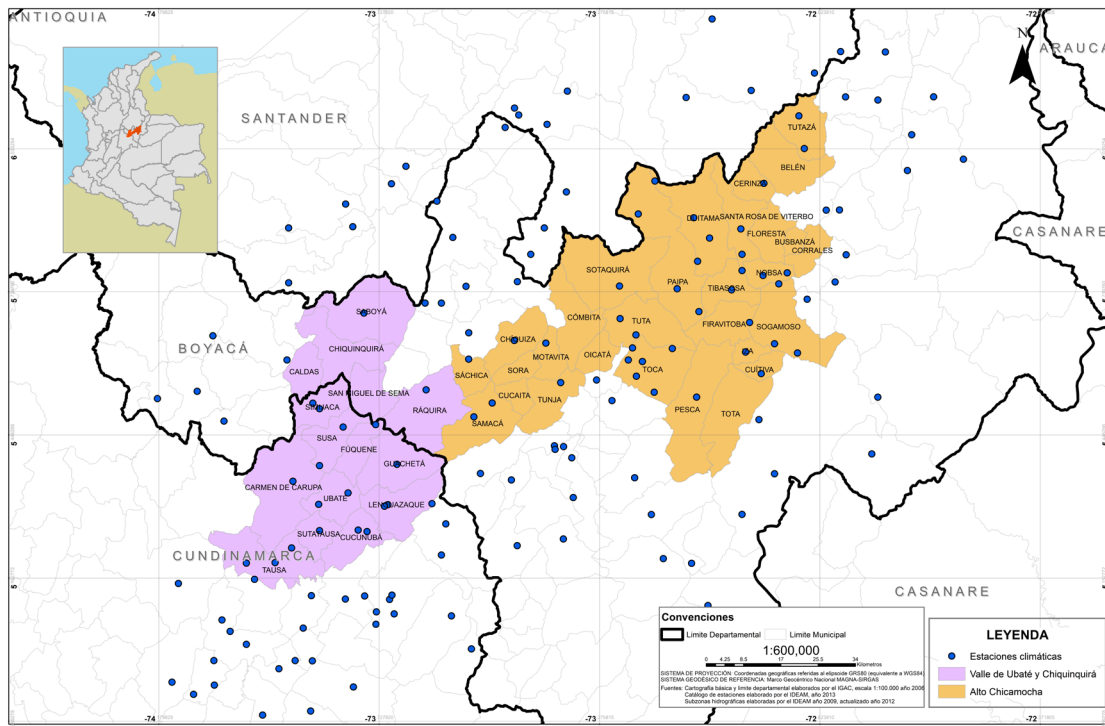


Figura 1. Localización de estaciones meteorológicas en el área de estudio. Colombia.

Tabla 2. Número de series por variable climática, por regiones en el estudio. Colombia.

Variable	Valle de Ubaté y Chiquinquirá	Alto Chicamocha
Precipitación (PPT)	82	108
Temperatura media (Tmed)	8	11
Temperatura máxima media (Tmáx)	6	10
Temperatura Mínima media (Tmin)	8	9
Humedad Relativa (HR)	8	18
Brillo Solar (BS)	6	12
Total	118	168

La región del Alto Chicamocha cuenta con 50 series de precipitación más que el Valle de Ubaté, sin embargo, dada su mayor extensión (145,333 ha más que el Valle de Ubaté y Chiquinquirá) debería contar con un mayor número de series de tiempo para cumplir las recomendaciones de la OMM (2017) (Figura 2A.)

Distribución espacial de los promedios anuales de precipitación

Al realizar el análisis global de la precipitación en el área de estudio, se identificaron tres patrones de comportamiento de lluvias, los

cuales se designaron como conglomerado 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 2B.).

El conglomerado 1 (color azul) agrupa 16 estaciones del Valle de Ubaté y Chiquinquirá y 18 del Alto Chicamocha, de las cuales 7 y 10, respectivamente, se ubican en el departamento de Santander. Estas estaciones presentan los mayores valores de precipitación con un promedio en el período 1980 - 2011 de 2212 mm/año con una distribución bimodal (Figura 2B.).

El conglomerado 2 (color rojo) agrupa 17 estaciones del Valle de Ubaté y Chiquinquirá y 18 del Alto Chicamocha, con un promedio anual de lluvias de 927 mm/año y 1619 mm/año, respectivamente, (Figura 2B). Debido a la influencia de los patrones de lluvia del piedemonte llanero, las estaciones en este conglomerado presentan distribución monomodal (Corpoica, 2012).

El conglomerado 3 (color verde) agrupa 50 estaciones del Valle de Ubaté y Chiquinquirá y 73 del Alto Chicamocha con precipitación promedio de 947 mm/año y 944 mm/año, respectivamente. En esta zona se presenta la menor precipitación promedio anual en la región del Alto Chicamocha (Figura 2B.). El conglomerado 3 comprende la mayor área en estudio, por lo que los análisis del comportamiento de la precipitación se concentraron en él.

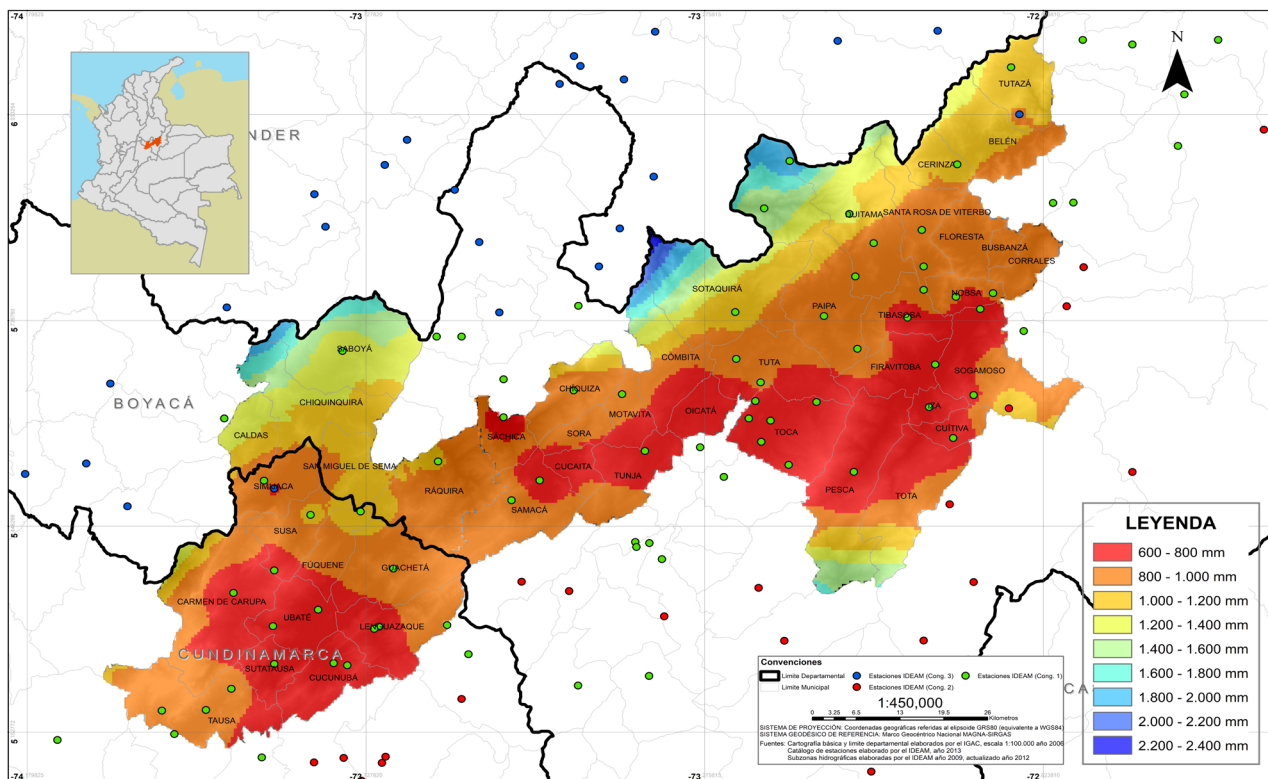


Figura 2A. Precipitación promedio período 1980-2011, según recomendaciones de la OMM (2017) en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y en el Alto Chicamocha, Colombia.

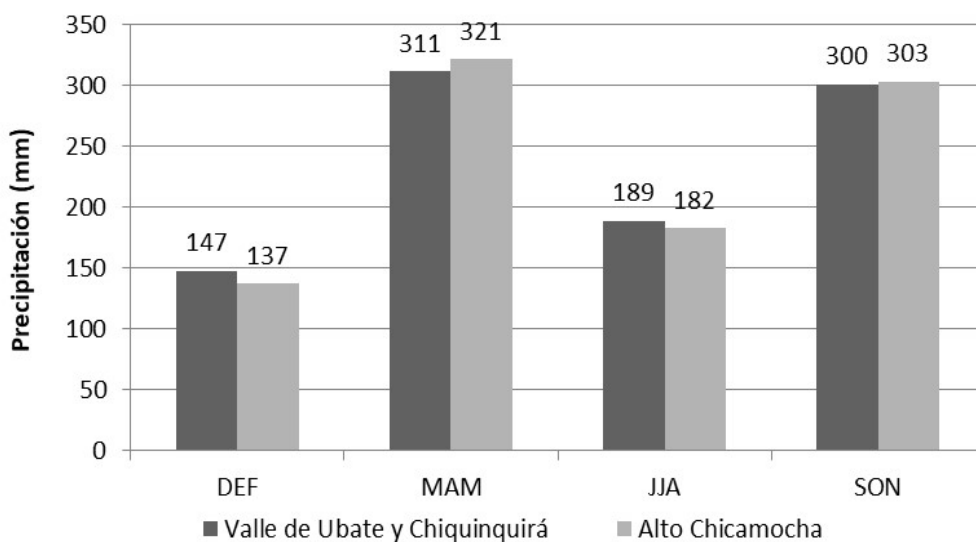


Figura 2B. Precipitación promedio por trimestre agrícola en las estaciones del conglomerado 3. en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y en el Alto Chicamocha, Colombia. DEF: diciembre-enero-febrero. MAM: marzo-abril-mayo. JJA: junio-julio-agosto. SON: septiembre-octubre-noviembre.

Distribución intra-anual de precipitación por períodos agrícolas. Según la distribución de las lluvias, se identificaron: una temporada seca (diciembre, enero y febrero, trimestre DEF), una de lluvias en el primer semestre (marzo, abril y

mayo —MAM), y un período de transición entre las temporadas de lluvia (junio, julio y agosto —JJA) y la temporada de lluvias del segundo semestre (septiembre, octubre y noviembre, trimestre —SON). Las lluvias del trimestre DEF

representaron 15% de la precipitación anual, mientras que los trimestres lluviosos (MAM y SON) comprendieron, aproximadamente, 32% cada una (Figura 2B).

No existieron grandes diferencias en los volúmenes trimestrales de precipitación entre ambas regiones (máximo 10 mm). En las temporadas secas se observaron menores valores de lluvias en la región del Alto Chicamocha, así como mayores valores de lluvia acumulada durante las temporadas húmedas (Figura 2B). Esto indica que, en promedio, se presentan mayores fluctuaciones en la precipitación a través del año en el Alto Chicamocha que en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá.

La diferencia trimestral de lluvias permite afirmar que la disponibilidad hídrica es menor durante el trimestre DEF, periodo en que se presentan los mayores problemas relacionados con ataque de plagas asociadas con aumento de temperatura del aire durante del día (Corpoica, 2012).

Variación interanual de la precipitación. En las Figuras 3 y 4 se observan las anomalías encontradas a partir de los promedios anuales en cada región. Las máximas anomalías positivas (exceso de lluvia) se registraron en 2010 y 2011 y las negativas (deficiencia de lluvia) en 1992 y 1997, lo cual coincide con eventos La Niña (exceso) y El Niño (deficiencia) (CPC, 2017).

Comportamiento de la precipitación en años extremos (exceso y déficit)

En el Valle de Ubaté y Chiquinquirá se observan grandes diferencias en el volumen de precipitación

respecto al promedio durante los trimestres MAM y SON con las mayores diferencias en abril (cerca de 200 mm) y octubre (cerca de 100 mm). En el trimestre JJA se observan menores diferencias, lo que supone una menor influencia de las fuentes de variabilidad climática durante este periodo en la región (Figura 5).

En el sur del valle se presentaron las mayores anomalías positivas, en el municipio de Cucunuba, donde se registró un aumento de 100% en la precipitación durante 2011. Los municipios Simijáca, Carmen de Carúpa, Ubaté, Sutatausa y Ráquira presentaron las mayores reducciones (entre 40% y 60%) durante 1997 (Figura 6).

En el municipio Lenguaque se presentaron aumentos entre 60% y 80% durante el evento La Niña 2011 y reducciones entre 0 y 20% durante el evento El Niño 1997 (Figura 6).

En el Alto Chicamocha se observaron diferencias considerables en los volúmenes de precipitación respecto al promedio, principalmente en abril y octubre (Figura 7). En los municipios de Samacá, Tunja, Motavita y Toca se duplicaron los promedios históricos durante el evento La Niña 2011; sin embargo, en algunas estaciones se registraron anomalías negativas, principalmente en Tutazá (Figura 8). En Samacá se presentaron aumentos entre 80% y 100% durante el evento La Niña de 2011 y reducciones entre 0 y 20% durante el evento El Niño de 1992 (Figura 8). En el evento El Niño 1992, en la región se presentaron reducciones entre 20% y 40% en la precipitación, mostrando un comportamiento más homogéneo que el observado en La Niña 2011 (Figura 8).

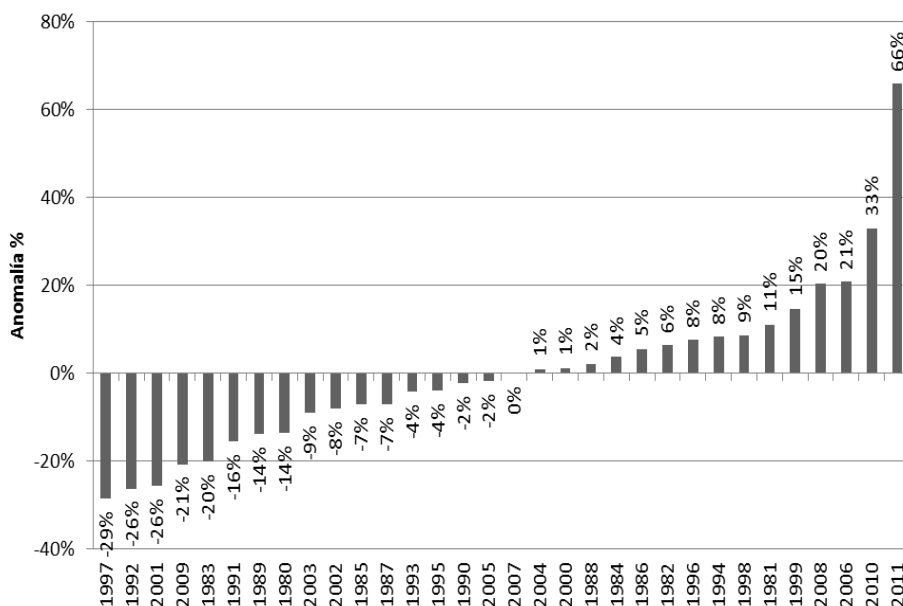


Figura 3. Anomalía porcentual anual en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá, Colombia.

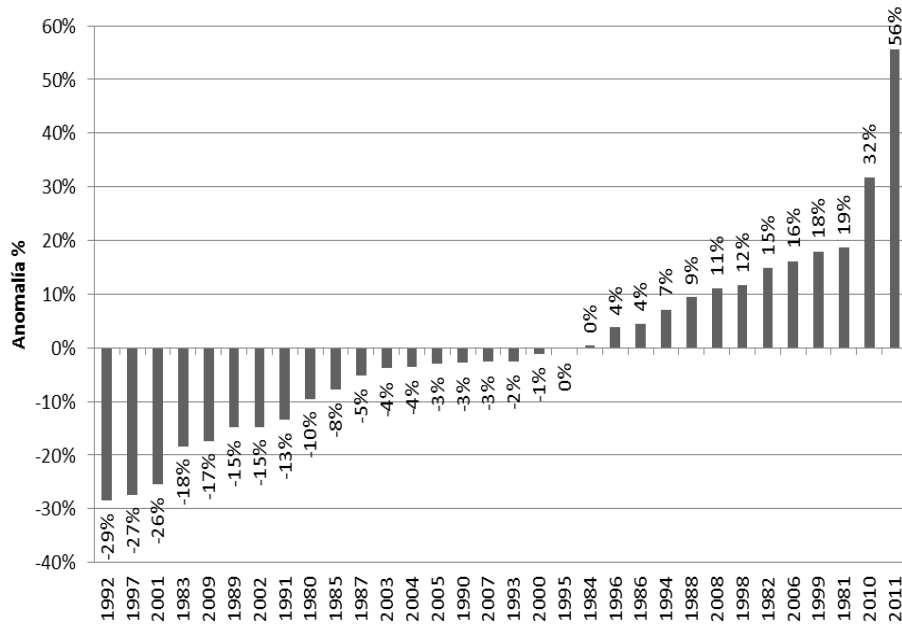


Figura 4. Anomalia porcentual en el Alto Chicamocha. Colombia.

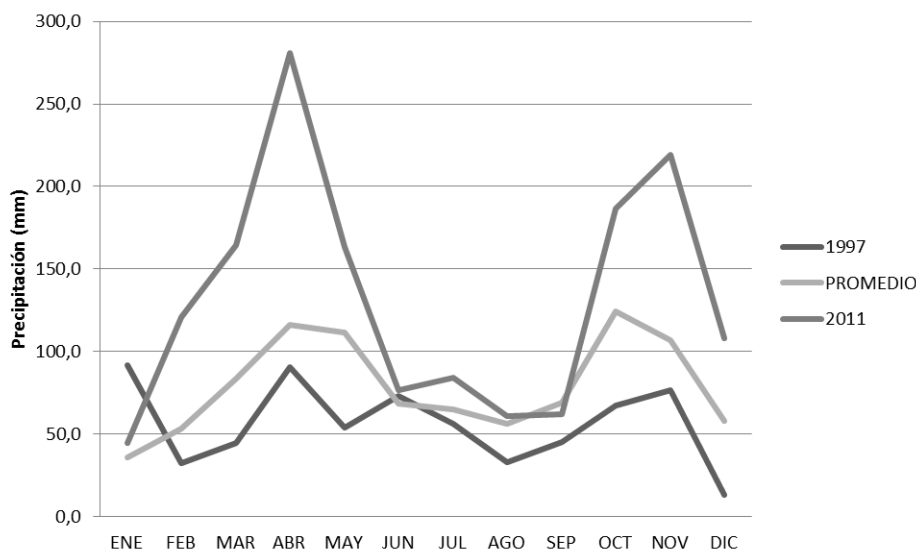


Figura 5. Precipitación mensual en los años extremos 1997 y 2011 y promedio para el período 1980-2011 en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá. Colombia.

Precipitación en eventos El Niño y La Niña

Existe una relación entre la precipitación y los eventos climáticos La Niña y El Niño (Caicedo, 2007). En las Figura 9 y 10 se observan incrementos de la precipitación bajo eventos La Niña (anomalía positiva) y reducciones bajo eventos El Niño (anomalía negativa) por trimestre. En las dos regiones se evidencian mayores anomalías durante los trimestres secos (DEF y JJA) que durante los trimestres de lluvia (MAM y SON).

Temperatura del aire

Las estaciones ubicadas en el área del Valle de Ubaté y Chiquinquirá no registran o no cumplen los parámetros de calidad para la variable temperatura del aire, por tanto a partir de interpolaciones de información registrada en estaciones ubicadas alrededor del área de estudio (en un diámetro de 30 km) se encontró que la temperatura máxima media fluctúa entre 18 y 23°C con los mayores valores hacia el norte en

límites con el departamento de Santander y valores entre 18 y 20°C en municipios como Cucunuba y Lenguaque. La temperatura mínima media varió entre 8 °C y 9 °C, con los menores valores hacia el sur del valle en los municipios Ubaté, Cucunuba, Sutatausa y Tausa.

En el Alto Chicamocha los menores valores se presentan hacia el nororiente en los municipios de Tutazá y Belén (entre 16 °C y 20 °C) y hacia el suroccidente en los municipios Tunja, Cucaita, Samacá y Motavita (entre 18 °C – 19 °C). La región del Alto Chicamocha es montañosa con pendientes que generan alta variabilidad de la

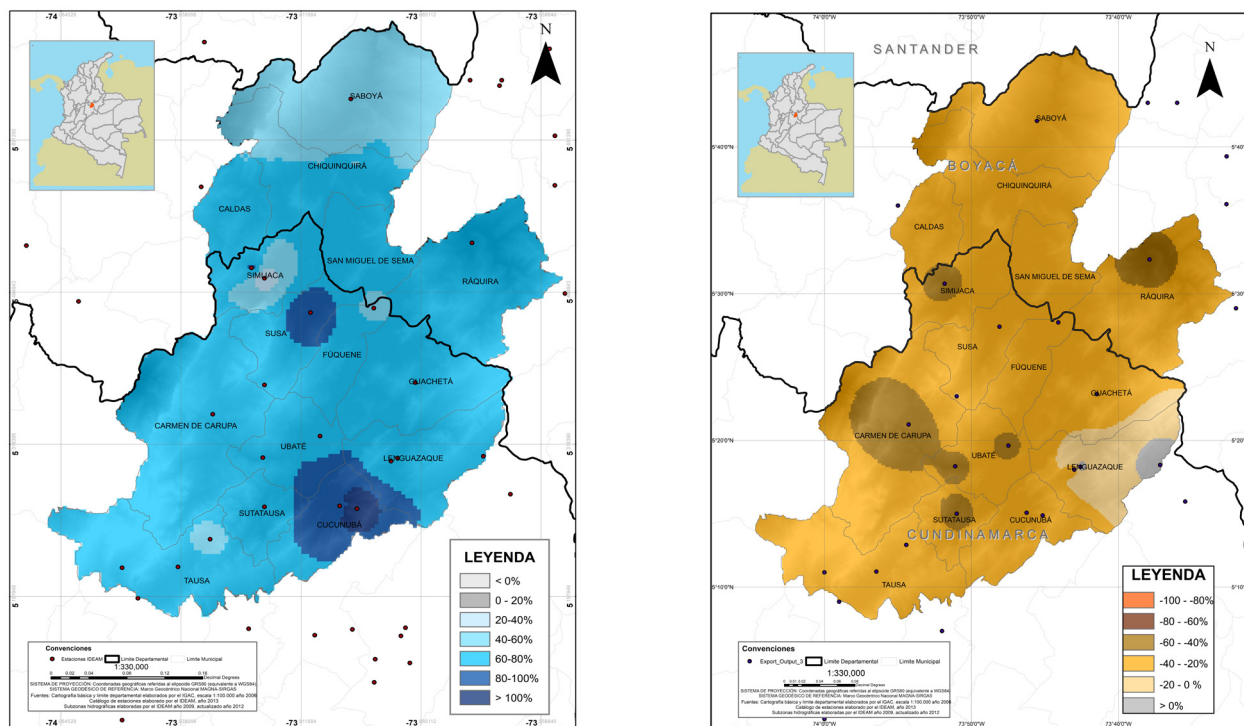


Figura 6. Anomalías porcentuales de precipitación en 2011 (izq.) y 1997 (der.) en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá. Colombia.

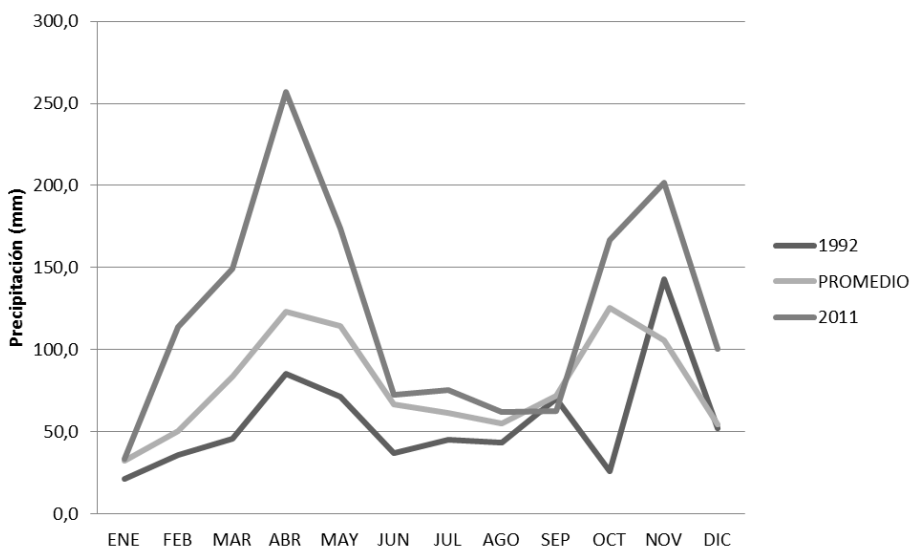


Figura 7. Precipitación mensual durante los años extremos 1992-2011 y promedio para el período 1980-2011 en la región del Alto Chicamocha. Colombia.

para las especies vegetales sensibles a fuertes cambios de temperatura durante el día (Snyder y Melo, 2010). La temperatura media del aire varió entre 13 °C y 15 °C en las dos regiones, siendo MAM el trimestre más cálido y JJA el más frío.

Humedad relativa

Los valores de la humedad relativa variaron entre 70% y 85% en ambas regiones. Los mayores valores en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá se observaron hacia el sur en los municipios Tausa y Cucunubá, sin embargo, estos valores son producto de interpolaciones a partir de estaciones cercanas, ya que la disponibilidad de información de humedad relativa es limitada en esta región. Se obtuvieron datos de la estación IDEAM del municipio de Fúquene: En esta estación los valores promedio de humedad relativa para el período 1980 - 2011 están en el orden de 78%, lo cual puede ser representativo para la zona central del valle.

En el Alto Chicamocha se logra un mejor ajuste debido a que se cuenta con información de siete estaciones ubicadas en el área. A partir de esta información se encuentra que los municipios con ambientes más húmedos (85%) son Tota, Cuitiva y la parte norte de los municipios de Duitama y Paipa. Por otro lado, Nobsa, Tutazá y la parte central y sur del municipio de Paipa, presentaron

menores porcentajes de humedad relativa promedio en el período 1980 - 2011 (73%).

El análisis intra-anual muestra correspondencia con las temporadas secas y lluviosas modales en la zona, con los valores más altos de humedad relativa en el trimestre MAM (83%) y los más bajos en el trimestre DEF (79%).

Brillo Solar

En el Valle de Ubaté y Chiquinquirá se observa un acumulado anual promedio de 1847.7 horas de brillo solar. La mayor acumulación de horas de brillo solar coincide con la mayor acumulación en la temporada seca (DEF) y los menores valores en la temporada de altas precipitaciones (MAM). Tal como se observa en las Figuras 11 y 12, las variables humedad relativa y precipitación se encuentran directamente relacionadas, mientras que brillo solar y precipitación muestran un comportamiento inverso (Corpoica, 2012).

En la región del Alto Chicamocha se observa un comportamiento similar entre las variables mencionadas al encontrado en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá (Figura 12), sin embargo, el acumulado anual promedio es menor en 121 horas de brillo solar (1726.6 horas), lo que indica que esta región tiene mayor nubosidad y esto interviene con la entrada directa de rayos solares a la superficie terrestre.

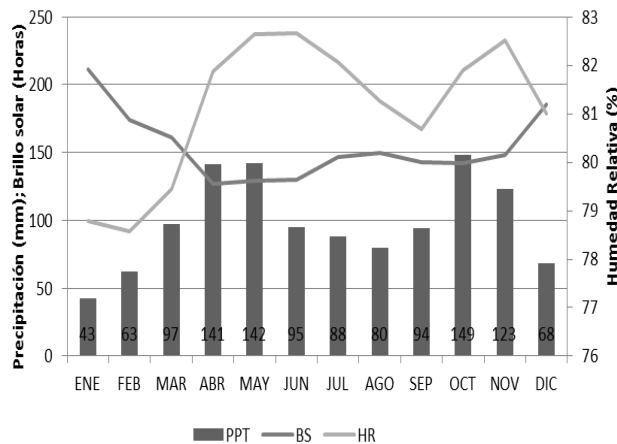


Figura 11. Comportamiento promedio intra-anual de las variables humedad relativa (HR) y brillo solar (BS) respecto a la precipitación (PPT) en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá, Colombia.

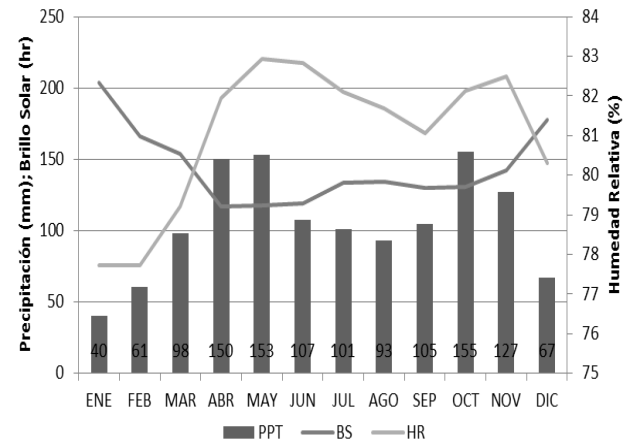


Figura 12. Comportamiento promedio intra-anual de las variables humedad relativa (HR) y brillo solar (BS) respecto a la precipitación (PPT) en el Alto Chicamocha.

Balance hidroclimático regional

En el Valle de Ubaté y Chiquinquirá la precipitación, promedio anual, fue de 1183 mm, mientras la ETo promedio fue de 1121 mm/año, lo que indica condiciones cercanas al equilibrio hídrico anual. Sin embargo, el promedio de precipitación en las estaciones del conglomerado 3 es de 947 mm/año frente a una ETo de 1122 mm/año; lo que indica que la deficiencia hídrica anual es de 175 mm.

En el municipio de Saboyá, en límites con el departamento de Santander, se evidencia un exceso hídrico de aproximadamente 100 mm por año; contrario a lo que se registra para el municipio de Cucunuba, el que presenta mayor déficit hídrico con cerca de 300 mm al año (Figura 13).

En el Alto Chicamocha el promedio de precipitación fue de 1259 mm/año, mientras que el promedio de ETo fue de 1103 mm/año.

Lo anterior indica que a escala anual existe un excedente hídrico regional. No obstante, si se analizan sólo las estaciones del conglomerado 3, el promedio de precipitación fue de 944 mm/año frente a un promedio de ETo de 1148 mm/año, lo que indica deficiencias hídricas de aproximadamente 203 mm por año, siendo este valor mayor que lo presentado en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá.

Los municipios de Sogamoso, Tibasosa, Iza, Toca, Pesca, Oicata y Tunja presentaron el mayor déficit hídrico de la región. Por otro lado, las áreas que limitan con el departamento de Santander registraron excesos hídricos que alcanzan los 1000 mm al año (Figura 13).

Susceptibilidad a excesos y deficiencias hídricas (PSDI)

En la Figura 14 se observa la distribución espacial de la frecuencia con que la disponibilidad hídrica toma valores categorizados como eventos

de deficiencia de humedad en el suelo según el índice PSDI (Palmer, 1965) en relación con la ocurrencia de condiciones normales.

En el Valle de Ubaté y Chiquinquirá el 28% del área muestra alta frecuencia a eventos de deficiencia hídrica, principalmente en los municipios Susa, Fúquene, San Miguel de Sema, Chiquinquirá y Saboyá (Figura 14). De manera general, esto significa que estos municipios son altamente susceptibles a la presencia de eventos de deficiencia hídrica a escala mensual.

En la región del Alto Chicamocha se observó alta frecuencia de ocurrencia de eventos de deficiencia hídrica en el 36% del área, principalmente en los municipios Motavita, Combita, Oicata, Tuta, Paipa, Sotaquirá, Tibasosa y hacia el norte, en los municipios Santa Rosa, Cerinza, Tutazá y Belén (Figura 14).

Ambas regiones son susceptibles a la ocurrencia de eventos de déficit hídrico en gran parte del área, ya que el 63% del área del Valle

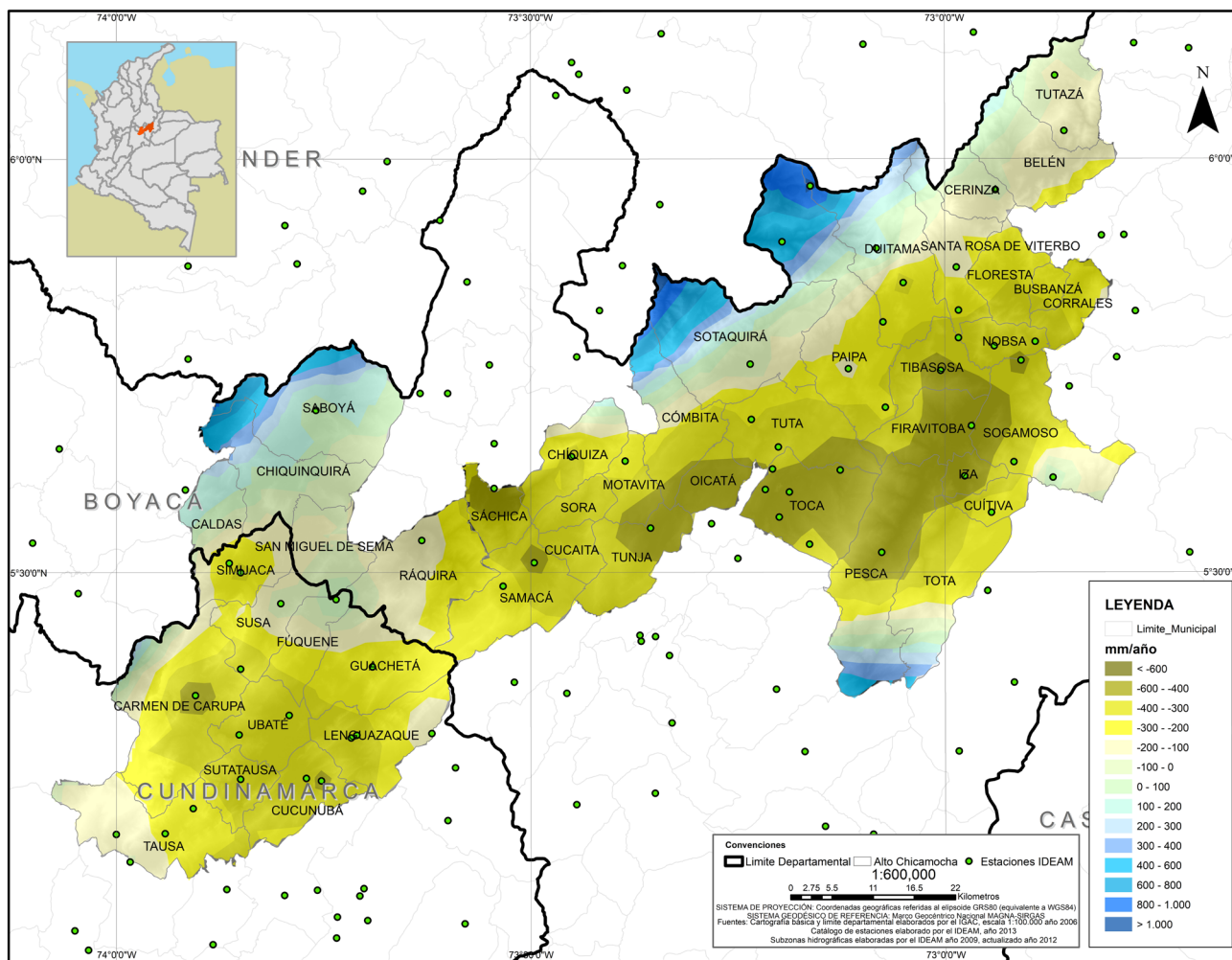


Figura 13. Balance hidrológico regional en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y en el Alto Chicamocha. Colombia

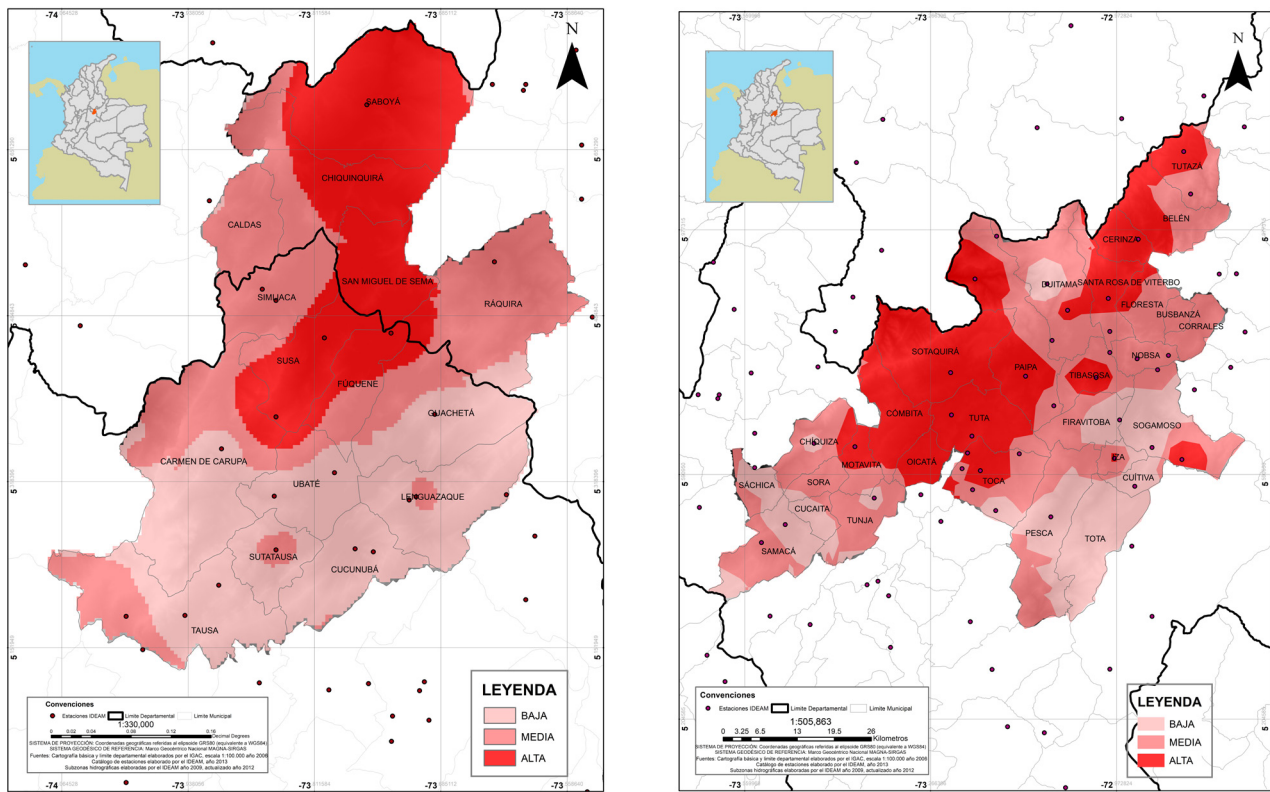


Figura 14. Frecuencia de ocurrencia de eventos de deficiencias hídricas en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá (izquierda) y el Alto Chicamocha (derecha). Colombia.

de Ubaté y Chiquinquirá y el 78% en el Alto Chicamocha se encuentran en las categorías de frecuencia alta y media (Figura 14). El 58% del área del Valle de Ubaté y Chiquinquirá presenta alta y media frecuencia de ocurrencia de eventos de exceso, principalmente hacia el norte de la región (Figura 15).

Se observó que los municipios Saboyá y Chiquinquirá son altamente susceptibles tanto a frecuencia de ocurrencia de eventos de déficit como de exceso, lo cual indica que estos municipios son fuertemente afectados por eventos de variabilidad climática.

En el Alto Chicamocha 68% del área presenta frecuencias alta y media de ocurrencia de eventos de exceso hídrico (Figura 15). Se observa que las áreas con alta frecuencia de condiciones de excesos y deficiencias hídricas coinciden espacialmente. En estas áreas se encuentran los municipios: Sotaquirá, Tutazá, Belén y Cerinza ubicados al norte de la región.

Discusión

Teniendo en cuenta la importancia de la región como nicho central de la producción lechera especializada del país (Carulla y Ortega, 2016) y de acuerdo con las características climáticas

encontradas en el presente estudio, es evidente el grado de vulnerabilidad al que está expuesto este renglón de la producción. Saboyá y Lenguezaque en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y Sotaquirá, Paipa y Cerinza en el Valle del Alto Chicamocha, son altamente vulnerables tanto a condiciones de sequía como de exceso hídrico. Esta situación es debida en gran medida a la acumulación de fenómenos meteorológicos o climáticos que no necesariamente son considerados extremos (IPCC, 2012).

En la mayor parte del territorio estudiado se observan condiciones de deficiencia hídrica tomando como base las condiciones normales en series históricas de 30 años, esto ratifica el hecho informado por el IPCC (2012) respecto a que las sequías pueden intensificarse en algunas zonas debido a la disminución de las precipitaciones y/o aumento de la evapotranspiración. En el caso del Valle de Ubaté y Chiquinquirá y del Alto Chicamocha esta situación se presenta principalmente por el aumento de la evapotranspiración, lo que coincide con resultados encontrados por Martínez et. al. (2017).

Las variaciones del clima en el altiplano cundiboyacense responden al movimiento estacional de la Zona de Convergencia Intertropical

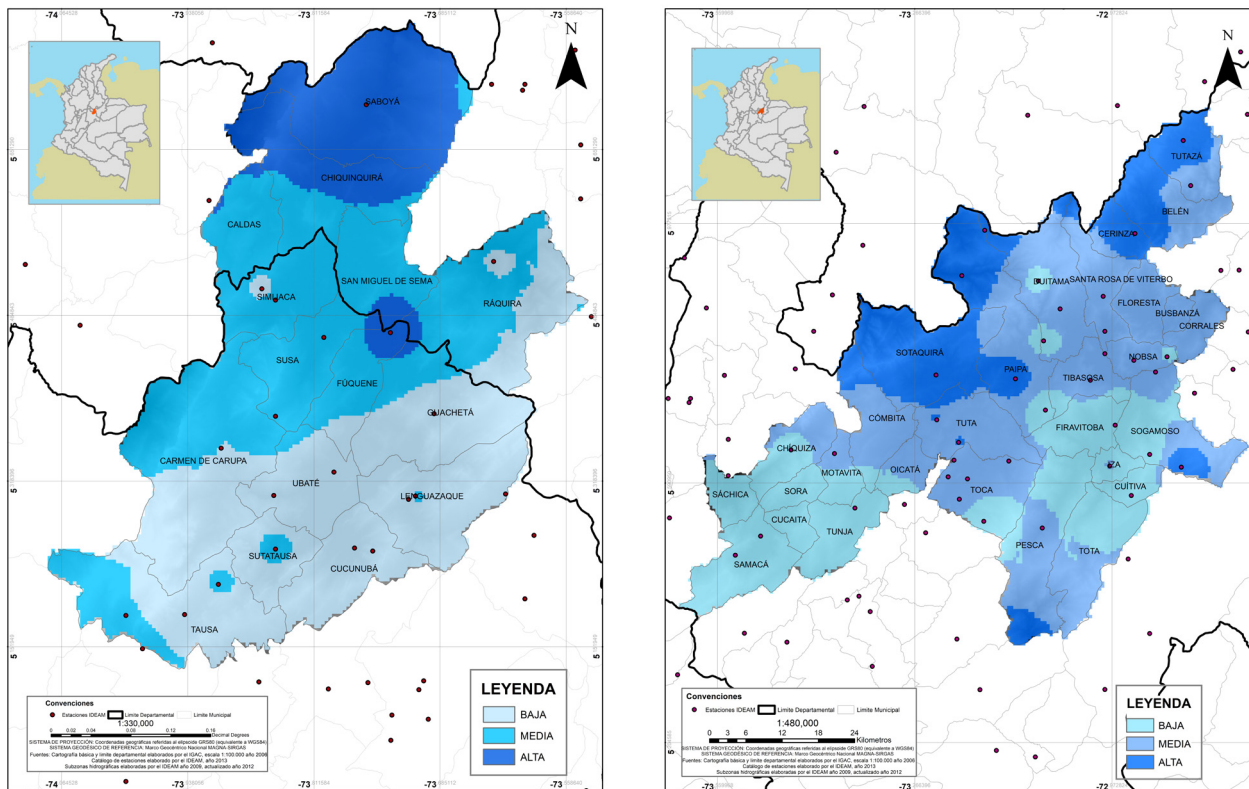


Figura 15. Frecuencia de ocurrencia de eventos de exceso hídrico para el Valle de Ubaté y Chiquinquirá (izquierda) y el Alto Chicamocha (derecha). Colombia.

(ZCIT) y su interacción con los eventos ENSO (Narváez y León, 2001) e inciden tanto en la cantidad como en la calidad de la leche que se produce (Corpoica, 2012; Tapasco et. al., 2015); por tanto es necesario desarrollar estrategias de manejo de pasturas para amortiguar la vulnerabilidad del sistema ganadero, conociendo los riesgos asociados con las particularidades climáticas actuales. El presente estudio es una aproximación a las características del clima en los últimos 30 años en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y el Alto Chicamocha.

Conclusiones

Identificar y definir patrones de comportamiento de la precipitación por región puede facilitar la planeación de acciones de mitigación y adaptación frente a eventos de exceso o déficit hídrico a escala local.

Con los resultados alcanzados en este estudio es posible priorizar esfuerzos en cuanto a planes y programas que beneficien la adaptación de la región frente a eventos de variabilidad climática.

Es importante considerar que la variabilidad natural seguirá siendo un factor determinante en los fenómenos climáticos extremos en el futuro.

Referencias

Alexandersson, H. 1986. A homogeneity test applied to precipitation data. *J. Climatol. Intern. J. Climat.* Issue 6. p. 641-659.

Allen, R.; Pereira, L.; Raes D.; y Smith M. 2006. *Evapotranspiración del cultivo. Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos*. Roma: Estudio FAO riego y drenaje 56. URL: <http://www.fao.org/docrep/009/x0490s/x0490s00.htm>

Caicedo, E. 2007. *El fenómeno de El Niño y su posible impacto en Colombia*. Reportes del emisor 92. p. 1-4. URL: <https://publicaciones.banrepcultural.org/index.php/emisor/article/view/7797/8177>

Carulla, J. E; Ortega, E. 2015. Sistemas de producción lechera en Colombia: Retos y oportunidades. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 24(2): 83-87. URL: https://www.researchgate.net/publication/317017699_Sistemas_de_produccion_lechera_en_Colombia_Retos_y_oportunidades

CEPAL. 2015. *Estudio económico de América Latina y el Caribe*. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.

Corpoica. 2009. *Caracterización de los sistemas de producción de leche del trópico de altura de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca*. Bogotá: Informe técnico final.

Corpoica. 2012. *Zonificación del impacto de la oscilación ENOS sobre las condiciones climáticas del Altiplano Cundiboyacense como base para*

- orientar la generación y transferencia de tecnología agropecuaria y reducir la vulnerabilidad climática. Bogotá: Informe técnico final.
- CPC. 2017. ENSO: *Recent Evolution, Current status and predictions*. Noviembre 13, 2017, de NOAA, USA. URL: http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml.
- Criollo, P.; Obando, M.; Sánchez, L.; y Bonilla, R. 2012. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano Cundiboyacense. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13-2, pp. 189-195. URL: <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/254>
- DANE. 2017. *Boletín Técnico comunicación informativa*. Agosto 22, 2017. de Bogotá. URL: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/pib/bol_ISE_jun2017.pdf
- García, M.; Piñeros, A.; Bernal, F.; Ardila, E. 2012. Variabilidad climática, cambio climático y el recurso hídrico en Colombia. *Revista de Ingeniería*. Universidad de los Andes. pp. 60-64. Sitio web: <http://www.scielo.org.co/pdf/ring/n36/n36a12.pdf>
- Gujarro, J.A. 2014. *User's guide to climatol*. State Meteorological Agency (AEMET), Baleric Islands Office. Spain.
- IDEAM. 2006. *Atlas de viento y energía eólica de Colombia*. Bogotá: Republica de Colombia, Ministerios de minas y energía. URL: <http://documentacion.ideam.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=1399>
- IDEAM. 2013. *Catálogo Nacional de estaciones*. Bogotá. URL: <https://www.datos.gov.co/Ambiente-y-Desarrollo-Sostenible/Cat-logo-Nacional-de-Estaciones-del-IDEAM/hp9r-jxuu/data>
- IGAC. 2005. *Estudio General de Suelos y Zonificación de Tierras del Departamento de Boyacá*. Bogotá: Subdirección de Agrología. URL: ftp://Ftp.Ciat.Cgiar.Org/DAPA/Users/Apantoja/London/Colombia/Suelos/00_Shape_Suelos/Proyecto_DNP/Memorias_Suelos_Oficiales/Boyaca/94864-Suelos%20Tomo%20I.pdf
- IGAC. 2000. *Estudio General de Suelos y Zonificación de Tierras del Departamento de Cundinamarca*. Bogotá: Subdirección de Agrología.
- IPCC. 2012. *Gestión de los riesgos de fenómenos meteorológicos extremos y desastres para mejorar la adaptación al cambio climático*. Grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. Cambridge. URL: https://wg1.ipcc.ch/srex/downloads/SREX_SPM_Spanish.pdf
- IPCC. 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer eds.]. Geneva, Switzerland. pp. 151. URL: <http://ar5-syr.ipcc.ch/>
- McCuen, R. 1998. *Hydrologic Analysis and Design*. Englewood Cliffs, NJ.: Prentice-Hall.
- Martínez, F.E.; Castillo, L.; Rojas, E.; Gómez D.; Aguilera, E. 2017. Identificación de áreas de riesgo agroclimático para el sistema de ganadería de leche en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá y Alto Chicamocha. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. Vol. 11, Núm 1pp. 170-183. URL: http://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/6159/pdf
- Narváez, G.; León, G. 2001. *Caracterización y zonificación climática de la región andina*. Meteorol. Colomb. 4: 121-126. Bogotá, D.C. Colombia. URL: http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/content/geociencias/revista_meteorologia_colombiana/numero04/04_13.pdf
- OMM. 2017. *Guía de prácticas climatológicas*. Septiembre 22, 2017. URL: http://www.wmo.int/pages/prog/wcp/ccl/guide/documents/wmo_100_es.pdf
- Palmer, W. 1965. *Meteorological Drought paper No. 45*. Whashington, D.C: U.S. Department of commerce. URL: <https://www.ncdc.noaa.gov/temp-and-precip/drought/docs/palmer.pdf>
- Ramírez, L.; y García I. 2006. Renovación de pasturas degradadas de kikuyo *Pennisetum Clandestinum*, Hoehst, con labranza mínima en una región alto andina de Colombia. *Acta Agronómica*, 53-3, pp. 69-75. URL: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/101
- Shepard, D. 1968. A two dimensional interpolation function for irregularly spaced data. *Proc. 23rd National Conference ACM*. p. 517-524. URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.154.6880&rep=rep1&type=pdf>
- Snyder R. y Melo, A. 2010. *Protección contra las heladas: fundamentos, práctica y economía*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, pp. 73-98. URL: <http://www.fao.org/docrep/012/y7231s/y7231s.pdf>
- Tapasco, J.; Martínez, J.; Calderon, S.; Romero, G.; Ordóñez, D.; Alvarez, A.; Sánchez, L.; y Ludeña, C. 2015. *Impactos Económicos del Cambio Climático en Colombia: Sector Ganadero*. Washington D.C: Banco Interamericano de Desarrollo. URL: https://publications.iadb.org/bitstream/handle/11319/7186/Impactos_economicos_cambio_climatico_Colombia_Sector_Ganadero.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Torres, M. 2011. Dinámicas socio-espaciales por causa del fenómeno de la Niña en el Valle de Ubaté y Chiquinquirá en el primer semestre de 2011. *Perspectiva Geográfica*, 16, pp. 83-102. URL: <http://revistas.uptc.edu.co/index.php/perspectiva/article/view/1751/1746>

Establecimiento *in vitro* de *Monstera acuminata* Koch y *Monstera deliciosa* Liebm

In vitro establishment of *Monstera acuminata* Koch and *Monstera deliciosa* Liebm

¹Nancy Mariel Casanova Palomeque, ^{1*} Vincenzo Bertolini, ² Leobardo Iracheta Donjuan

1. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Mexico, 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CERI), Tuxtla Chico, México. *Autor para correspondencia: vin.bertolini@gmail.com

Rec.: 2018-10-30 Acep.: 2019-06-25

Resumen

En el estudio se evaluó el establecimiento aséptico de *Monstera acuminata* Koch y *Monstera deliciosa* Liebm (Araceae) a partir de hojas y la inducción de la organogénesis *in vitro* de *M. acuminata* K. a partir de discos de tallos de brotes jóvenes. Para el efecto se aplicaron diferentes protocolos de desinfección a hojas maduras y brotes jóvenes, de los cuales se extrajeron explantes foliares de 1 cm² y discos de tallo de 1 mm de grosor, aproximadamente. Los explantes se establecieron en medios semisólidos con diferentes tratamientos hormonales durante la etapa de establecimiento aséptico e inducción de la organogénesis. La desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% por 20 min y el medio Murashige y Skoog (1962) al 50% con el preservador para cultivo de tejidos vegetales (PPM) favoreció una menor oxidación en los explantes foliares de ambas especies. Todos los explantes de *M. deliciosa* en ambos tratamientos cultivados en medio adicionado con PPM y a diferentes protocolos de desinfección sobrevivieron, no presentaron contaminación y más de 80% conservó actividad celular hasta 49 días de edad de cultivo. A los 35 días de cultivo, con la desinfección en Tween-20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.5%, y la siembra de los explantes en el medio MS adicionado con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de AIA y 0.1 mg/l de ANA se indujeron siete brotes nuevos de discos de tallo. *Monstera deliciosa* presentó mayor capacidad de adaptación a condiciones *in vitro*. Los avances en el establecimiento aséptico y en la inducción de la organogénesis en aráceas nativas para la producción de mimbre, son la base para la conservación *ex situ* de las poblaciones locales.

Palabras clave: Araceae, conservación *ex situ*, establecimiento aséptico, explantes foliares, organogénesis.

Abstract

In this paper we present the bases for the aseptic establishment of *Monstera acuminata* Koch and *Monstera deliciosa* Liebm (Araceae) from leaves and the induction of *in vitro* organogenesis of *M. acuminata* K. from discs of stems of young shoots. Different disinfection protocols were applied to mature leaves and young shoots, from which foliar explants of 1 cm² of both species were extracted, and stem disks approximately 1 mm of thick in *M. acuminata* K. The explants were established in semi-solid media with different hormonal treatments during the stage of aseptic establishment and induction of organogenesis. Disinfection with 3 % of sodium hypochlorite (NaClO) for 20 min and 50 % Murashige y Skoog medium (1962) with PPM, led to less oxidation in the leaf explants of both species. All the explants in the two treatments belonging to *M. deliciosa*, grown in medium added with PPM and different disinfection protocols, survived, did not present contamination and more than 80 % maintained answer's capacity until 49 days of culture. After 35 days of culture, with disinfection in Tween 20 + Ethanol 20% + 2.5% NaClO, and sowing of the explants in the MS medium added with 1 mg/l of BAP, 0.5 mg/l of AIA and 0.1 mg/l of ANA were indueces seven new shoots of stem disks. *M. deliciosa* had better ability to adapt to *in vitro* conditions. Advances in the establishment and induction of organogenesis in native araceas for wicker production are the basis for *ex situ* conservation of local populations.

Index words: Araceae, aseptic establishment, *ex situ* conservation, foliar explants, organogenesis.

Introducción

La conservación de poblaciones silvestres de aráceas es de importancia porque de ellas se obtienen fibras para diversos usos en América Latina. *Monstera deliciosa* Liebm. y *Monstera acuminata* Koch son dos especies de esta familia vegetal, útiles para la construcción de herramientas de cestería, artesanías y muebles, además poseen valor cultural y económico en las comunidades Mam del Volcán Tacaná, Chiapas, México (Acebey et al., 2007). Ambas especies son elementos propios del Bosque Mesófilo de Montaña (BMM), ecosistema mexicano amenazado por la deforestación (Villaseñor, 2016) por tanto, y debido a su importancia cultural y artesanal, deben ser rescatadas bajo técnicas apropiadas de conservación *ex-situ*.

El cultivo *in vitro* es una técnica posible que permite almacenar, seleccionar y mantener el germoplasma bajo condiciones asépticas, para introducirlo de nuevo a su hábitat natural (Reed et al., 2013). En aráceas este método de cultivo ha sido poco documentado. Montes et al. (2004) en hojas juveniles de *Anthurium andreanum* L. encontraron que la desinfección *in vitro* con doble inmersión en NaClO al 0.53% + Tween-20 por 30 min, seguido de otra inmersión en NaClO al 0.27% + Tween-20 por 20 min, resultó eficiente para asegurar el 96% del material vegetal aséptico; mientras que Materán-Oviedo et al. (2008) recomiendan la desinfección con NaClO al 2.5% v/v, durante 15 min, seguido de la inmersión en una solución de 50 mg/l de benomyl + cisteína por 1 min.

La inducción de callo organogénico a partir de explantes foliares ha sido posible en *Anthurium andreadrum* L., según Atak y Celik (2009) empleando sales MS (1962) con 50% de la concentración de sales, suplementadas con 0.6 mg/l de ácido 2,4-diclorofenilacético (2,4-D) y 1 mg/l de benciladenina (BA); mientras que Valle-Sandoval et al. (2008) recomiendan el uso de sales MS (1962), 3% de sacarosa y 0.6 % de agar, en combinación con bencilaminopurina (BAP) a 2 mg/l y ácido indolacético (AIA) de 0.1 - 1.8 mg/l ó 0.1 mg/l de 2, 4-D y 1 mg/l de BA, para la inducción de brotes a partir de discos de tallo.

Debido a la falta de protocolos de desinfección e inducción *in vitro* de plantas de la familia aráceas de interés (*Monstera* sp., entre ellas) el objetivo de esta investigación fue establecer los protocolos para el establecimiento aséptico y la inducción de la organogénesis *in vitro* de *M. acuminata* Koch y *M. deliciosa* Liebm, a partir de hojas y discos de tallos de brotes.

Materiales y métodos

Para el estudio, las plantas de *M. deliciosa* L. y *M. acuminata* K. fueron recolectadas en comunidades del Soconusco (Chiapas, México), respectivamente en Fracción Barrio Nuevo (N 15° 04.112", O 92° 06.740") y en Guadalupe (N 14° 58.13", O 92° 18.117"). Los esquejes recolectados fueron conservados en condiciones de invernadero a 25 ± 2 °C y 77% de humedad relativa por un lapso de 80 días, en las instalaciones del Campo Experimental Rosario Izapa, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CERI-INIFAP).

Establecimiento aséptico de *M. acuminata* y *M. deliciosa*

En este caso, para obtener los explantes fueron utilizadas dos hojas maduras por especie. En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CERI-INIFAP, las hojas fueron lavadas con una solución de 5 ml de jabón neutro en 200 ml de agua. Para obtener cuatro segmentos de 3 x 12 cm por hoja, previamente se eliminó la nervadura principal antes de su correspondiente desinfección.

El primer protocolo de desinfección consistió en la inmersión de las hojas en una solución antioxidante fungicida en agitación constante compuesta por 30 g/l de sacarosa + 100 mg/l de ácido ascórbico Meyer® + 150 mg/l de ácido cítrico Meyer® + 1.5 g/l de azoxistrobin (Amistar Sygenta®), durante 15 min. Se realizaron dos lavados con agua esterilizada; luego se sumergieron en una solución de etanol CTR® a 70% por 15 s, después en una solución de 2.5% de hipoclorito de sodio (NaClO, producto comercial Cloralex®) con tres gotas de Tween®-20 por 20 min en constante agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada durante 2 min cada uno y por último, se colocaron durante 5 min en la solución antioxidante, anteriormente descrita.

El segundo protocolo de desinfección difirió del primero, ya que la inmersión en la solución antioxidante fungicida se hizo en agitación constante durante 3 min en bomba de vacío con doble inmersión en NaClO a 1.25% + tres gotas de Tween-20 por 15 min y en NaClO al 0.83% + tres gotas de Tween-20 por 10 min. Entre cada inmersión se realizaron dos lavados de 2 min cada uno, y tres lavados con agua destilada esterilizada antes de la inmersión en la solución antioxidante.

Se prepararon tres diferentes medios de cultivo. El primero fue el testigo que consistió en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con 50% de las sales minerales, adicionado con las vitaminas de Gamborg (Gamborg et al., 1968), tiamina (0.4 mg/l), inositol (100 mg/l), sacarosa

(30 g/l), Phytigel Sigma® (3 g/l) y los reguladores de crecimiento: ácido 2,4-D Sigma® (1 mg/l) y BAP Sigma® (0.2 mg/l). El segundo consistió en el medio testigo adicionado con el fungicida azoxistrobin Amistar® (1 g/l) y Polivinilpirrolidona (PVP) Sigma® (2 g/l); y el tercero fue el medio testigo adicionado con el agente Preservative for Plant Tissue Culture (PPM) Plant Cell Technology. Inc™ (1 ml/l). Los medios de cultivo se esterilizaron a 120 °C y 101325 kg/cm² de presión por 20 min en autoclaves antes de ser colocados en placa Petri de 60 X 15 mm con 10 ml en campana de flujo.

En total se construyeron 12 tratamientos con 20 repeticiones cada uno (Tabla 1). Las hojas desinfectadas se disectaron en segmentos de 1 cm², cada explante fue colocado en placas Petri e incubado bajo condiciones de oscuridad durante 49 días. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de supervivencia, la contaminación, la actividad celular y la oxidación. La medición de las variables supervivencia, contaminación y actividad celular (crecimiento) fue de carácter binomial, con 1 (presencia) y 0 (ausencia), mientras que la variable oxidación fue medida por la proporción de la superficie del explante oscurecida, con porcentajes fijos de 20, 25, 50, 75 y 100 %. Las evaluaciones se hicieron cada 7 días hasta 49 días después de la siembra.

Tabla 1. Tratamientos para el establecimiento aséptico de *M. acuminata* y *M. deliciosa*. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Trat (no.)	Especie		Protocolo de desinfección		Medio de cultivo		
	<i>M. acuminata</i>	<i>M. deliciosa</i>	SAF + 70% Etanol + 2.5% NaClO + SA	SAF BV + 70% Etanol + 1.25% NaClO + 0.83% NaClO + SA	Medio Testigo (MT)	MT + Amistar + PVP	MT + PPM
1	+	-	+	-	-	+	-
2	+	-	+	-	-	-	+
3	+	-	+	-	+	-	-
4	+	-	-	+	-	+	-
5	+	-	-	+	-	-	+
6	+	-	-	+	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	-	+	+	-	-	-	+
9	-	+	+	-	+	-	-
10	-	+	-	+	-	+	-
11	-	+	-	+	-	-	+
12	-	+	-	+	+	-	-

Trat. = Tratamiento, SAF= Solución antioxidante fungicida, SAF BV= Solución antioxidante fungicida en bomba de vacío, NaClO= hipoclorito de sodio, SA= Solución antioxidante, MT= Medio testigo, PVP= Polivinilpirrolidona, PPM= Preservative for Plant Tissue Culture. + = Tratamiento aplicado.

Análisis estadístico de datos

El experimento consistió en un diseño trifactorial: 2 especies, 2 protocolos de desinfección, 3 medios de cultivo. El análisis estadístico de las respuestas contaminación, reactivación y oxidación se hizo a través de un modelo lineal generalizado (GLM), con una distribución binomial para las respuestas de contaminación y actividad celular y distribución normal para la oxidación. Las comparaciones múltiples entre tratamientos fueron realizadas con la aplicación de Bonferroni y un nivel de significancia de 5%. Los datos de supervivencia fueron analizados a través de un modelo con censura por intervalo, aplicando la prueba de 'log rank' ponderada asintótica con un nivel de significancia de 5% en un programa estadístico R versión 2.3 para Windows (R Core Team, 2017).

Inducción a la organogénesis en *M. acuminata*

En invernadero se seleccionaron brotes de *M. acuminata* de una longitud, promedio, de 6.6 cm y diámetro de 4.5 mm. El primer protocolo de desinfección consistió en la inmersión de los brotes en una solución de jabón quirúrgico Antibenzil Farmacéuticos Altamirano® al 3% durante 3 min; luego en una solución de Etanol CTR® al 70% por 1 min, y posteriormente en una solución de NaClO Cloralex® al 1.25% + 0.5 ml de Tween-20, por 10 min, todos en constante agitación. Se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 3, 4 y 5 min y por último, los brotes fueron inmersos en la solución antioxidante antes descrita, durante 5 min (Valle-Sandoval et al., 2008).

En el segundo protocolo de desinfección, los explantes fueron lavados con agua de grifo + 2 gotas de Tween-20 durante 5 min, después de inmersos en una solución de Etanol CTR® al 20% por 10 s fueron lavados con agua esterilizada, luego se colocaron por 20 min en una solución de NaClO al 2.08% + 2 gotas de Tween-20, en agitación constante. Se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 3, 4 y 5 min y, por último, fueron inmersos en una solución antioxidante con benomil Promyl® + cisteína Sigma® (1:1) a 50 mg/l durante 5 min (Materán-Oviedo et al., 2008).

Los medios de cultivo se prepararon con sales Murashige y Skoog (1962), vitaminas Gamborg (Gamborg et al., 1968), tiamina (0.4 mg/l), inositol (100 mg/l), sacarosa (30 g/l) y Bacto™ Agar BD (6 g/l). En el primer medio de cultivo se adicionaron los reguladores de crecimiento BAP Sigma® a 1 mg/l, AIA Sigma® a 0.5 mg/l, y ácido naftalenacético (ANA) Sigma® a 0.1 mg/l: En el

segundo medio se adicionaron BAP Sigma® a 2 mg/l y AIA Sigma® a 1 mg/l, y ANA Sigma® a 0.5 mg/l. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 101325 kg/cm² de presión por 20 min. En campana de flujo laminar (Purifier® series, Labconco®) se colocaron 10 ml en placa Petri de 60 x 15 mm.

Los brotes sin hojas envolventes se cortaron en discos de 1 mm de grosor (explante) bajo un estereoscopio Reichert®. La siembra se realizó en forma rápida para evitar la oxidación del tejido y se respetó la polaridad positiva de los discos, según la sección de los brotes apical, media y basal. Se utilizó un brote para cada tratamiento, y en total se establecieron cuatro tratamientos con diferentes repeticiones.

Los explantes de los tratamientos 1 y 2 fueron sometidos al primer protocolo de desinfección consistente en jabón al 3% + etanol al 70% + NaClO al 1.25 % + solución antioxidante, mientras que los de los tratamientos 3 y 4 fueron sometidos al segundo protocolo (Tween-20 + etanol al 20% + NaClO al 2.08% + solución benomil + cisteína). Los explantes de los tratamientos 1 y 3 se cultivaron en el medio adicionado con BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l), y los de los tratamientos 2 y 4 en el medio adicionado con BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l).

Los tratamientos fueron mantenidos durante 14 días en condiciones de oscuridad a 28 °C y luego en fotoperiodo de 16 h. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de supervivencia, la contaminación, la inducción de brotes y la formación de callo, tomando como medidas valores de 1 para la presencia y 0 para la ausencia. La variable oxidación se midió con porcentajes fijos de 20, 25, 50, 75 y 100%, de acuerdo con la proporción de la superficie del explante que presenta respuesta, y el número de brotes nuevos por tratamiento. Las evaluaciones se hicieron cada 7 días hasta el día 35 después de la siembra.

Con el uso de un estereoscopio Zeiss® (1.0 X FWD 81 mm) se llevaron a cabo cortes histológicos a mano alzada de los brotes inducidos, con el fin de conocer su origen celular. Los cortes fueron teñidos con dos gotas de fluoroglucinol al 0.05% por 2 min y una gota de ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 N por 2 min, para su observación en el microscopio de luz Velab® al 4X, 10X y 40X.

Análisis de los datos

El análisis de las variables respuesta fue descriptivo. Se graficaron los porcentajes de oxidación, actividad celular y formación de callo por cada sección del brote (apical, medio y basal) a los 35 días después de la siembra en el programa estadístico R versión 2.3 para Windows.

Resultados

Establecimiento *in vitro* de *M. acuminata* y *M. deliciosa*

En el establecimiento aséptico de explantes foliares en ambas especies se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos para la variable supervivencia ($\chi^2 = 77.6657$, $gl = 11$, $P = 4.165e-12$). Cuarenta y nueve días después de la siembra los explantes de *M. deliciosa* presentaron mayor sobrevivieron que los de *M. acuminata* (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de los tratamientos en los porcentajes de supervivencia de los segmentos de hoja madura 49 días después de la siembra. Promedios de 20 repeticiones por tratamiento. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Tratamiento	Supervivencia (%)
T1. <i>M. acuminata</i> + 2.5 % NaClO + MS (A + PVP)	43.30 b*
T2. <i>M. acuminata</i> + 2.5 % NaClO + MS (PPM)	50.00 b
T3. <i>M. acuminata</i> + 2.5 % NaClO + MS	40.00 b
T4. <i>M. acuminata</i> + 1.25 % + 0.83% NaClO + MS (A + PVP)	45.00 b
T5. <i>M. acuminata</i> + 1.25 % + 0.83% NaClO + MS (PPM)	45.00 b
T6. <i>M. acuminata</i> + 1.25 % + 0.83% NaClO + MS	25.00 b
T7. <i>M. deliciosa</i> + 2.5 % NaClO + MS (A + PVP)	95.00 a
T8. <i>M. deliciosa</i> + 2.5 % NaClO + MS (PPM)	100.00 a
T9. <i>M. deliciosa</i> + 2.5 % NaClO + MS	85.00 ab
T10. <i>M. deliciosa</i> + 1.25 % + 0.83 % NaClO + MS (A + PVP)	90.00 a
T11. <i>M. deliciosa</i> + 1.25 % + 0.83 % NaClO + MS (PPM)	100.00 a
T12. <i>M. deliciosa</i> + 1.25 % + 0.83 % NaClO + MS	85.00 ab

*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes (log rank ponderada asintótica, $P < 0.05$). NaOCl= hipoclorito de sodio, MS= Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), A= Amistar, PVP= Polivinilpirrolidona, PPM= Preservative for Plant Tissue Culture.

El análisis estadístico de la actividad celular mostró que la respuesta o actividad en los explantes tuvo interacción significativa entre tratamientos ($\chi^2 = 48.082$, $gl = 11$, $P = 1.38e-06$) y el tiempo ($\chi^2 = 330.84$, $gl = 1$, $P = 0.01$). La actividad celular consistió en el doblamiento, alargamiento e hinchazón de los segmentos de la hoja. Cuarenta y nueve días después de la siembra, solo los tratamientos 8, 10, 11 y 12 presentaron porcentajes superiores a 80% de actividad celular, seguido de los tratamientos 9 y 7; mientras que en los tratamientos 1, 2, 3 y 5 esta actividad varió entre 60 y 40%, y en los tratamientos 4 y 6 fue menor que 40% (Figura 1).

En el análisis de varianza del modelo logístico de contaminación se observó que el tiempo de cultivo influyó en la contaminación de los explantes ($\chi^2 = 80.089$, $gl = 1$, $P = 0.01$) y a los 49 días se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($\chi^2 = 23.694$, $gl = 7$, $P = 1.29E-03$).

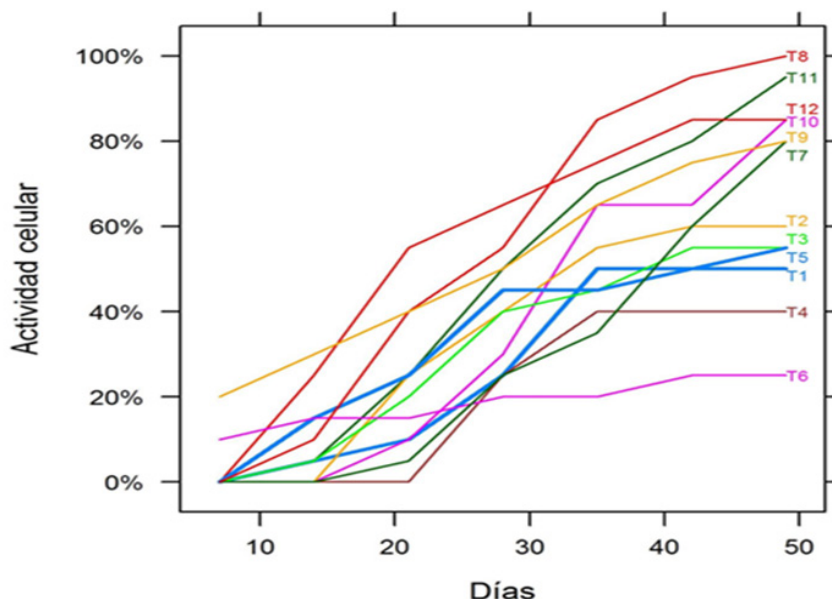


Figura 1. Curvas de actividad celular de *M. deliciosa* y *M. acuminata* en los tratamientos evaluados. T= Tratamiento. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

La contaminación fúngica en los explantes fue más frecuente que la bacteriana. Los explantes de *M. deliciosa* desinfectados por el primer protocolo —solución antioxidante fungicida + 70% Etanol + 2.5% NaClO + Solución antioxidante— y sembrados en medio de cultivo con Amistar + PVP (tratamiento 7) y en el medio con PPM (tratamientos 8); y el tratamiento 11 del segundo protocolo —solución antioxidante fungicida en bomba de vacío + 70% Etanol + 1.25% NaClO + 0.83% NaClO + Solución antioxidante— en medio de cultivo con PPM no presentaron contaminación.

El tratamiento 10 —*M. deliciosa* + segundo protocolo de desinfección + medio MS (A + PVP)— presentó una baja respuesta (5%). Los tratamientos 9 y 12 —explantes de *M. deliciosa* en medio MS testigo, pero desinfectados con diferentes protocolos— presentaron porcentajes de contaminación inferiores a 30% y fueron significativamente diferentes al tratamiento 4 —*M. acuminata* + segundo protocolo de desinfección + medio MS (A + PVP)— con 55% y al tratamiento 6 —*M. acuminata* + segundo protocolo de desinfección + medio MS testigo— con 75%; mientras que en el resto de los tratamientos más de la mitad de los explantes presentaron niveles de contaminación entre 50 y 55%).

La oxidación en los explantes se presentó a partir del tercer día después de la siembra. El análisis mostró efectos independientes por factor, siendo altamente significativos ($P < 0.005$) los efectos de la especie y del medio de cultivo ($P < 0.0001$) y significativo ($P < 0.02$) para el protocolo de desinfección.

Inducción de la organogénesis en *M. acuminata*

Treinta y cinco días después de la siembra la sobrevivencia de los explantes en los tratamientos 1 y 3 —BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l)— fue mayor que 80%, mientras que en los tratamientos 2 y 4 —BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l)— fue menor.

El porcentaje de oxidación en los discos de tallo fue mayor en el tratamiento 4 compuesto por el segundo protocolo de desinfección —Tween 20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.08% + Solución benomil + cisteína) y BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l— seguido de los tratamientos 2 —primer protocolo de desinfección (Jabón al 3% + Etanol al 70% + NaClO al 1.25% + Solución antioxidante) + BAP (2 mg/l) + AIA (1 mg/l) + ANA (0.5 mg/l— y por el tratamiento 3 —segundo protocolo de desinfección + BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l)— mientras que en el tratamiento 1 —primer protocolo + BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l)— fue menor que 60%.

Los discos de tallo presentaron contaminación bacteriana con mayor frecuencia en los explantes basales. Los explantes de los tratamiento 3 y 4 que fueron desinfectados por el segundo protocolo de desinfección —Tween-20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.08% + Solución benomil + cisteína— presentaron porcentajes inferiores de 10%, mientras que los explantes de los tratamientos 1 y 2 desinfectados con el primer protocolo —Jabón al 3% + Etanol al 70% + NaClO al 1.25% + solución antioxidante— mostraron porcentajes superiores a 30%, indicando que el segundo

protocolo de desinfección fue más eficiente que el primero (Tabla 3).

Los tratamientos 2 y 3 presentaron porcentajes de actividad celular superiores a 80%. El tratamiento 3 presentó mayor número de explantes con brotes nuevos, seguido de los tratamientos 1 y 4; mientras que los explantes del tratamiento 2 formaron callo friable en mayor número que los demás tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de especie, protocolo de desinfección y medio de cultivo, en los porcentajes de oxidación de los segmentos de hoja madura 49 días después de la siembra. Promedios de veinte repeticiones por tratamiento. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Variable	Oxidación (%)
Especie	
<i>Monstera acuminata</i> K. Koch.	73.36 ± 26.78 [†] a*
<i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	42.64 ± 18.54 [†] b
Protocolo de desinfección	
SB + 2.5 % NaClO	56.12 ± 26.59 [†] a
CB + 1.25 % + 0.83 % NaClO	59.88 ± 28.62 [†] b
Medio de cultivo	
MS 50 % + BAP / 2,4-D + Amistar / PVP	63.85 ± 25.02 [†] a
MS 50 % + BAP / 2,4-D	57.62 ± 29.86 [†] b
MS 50 % + BAP / 2,4-D + PPM	52.53 ± 26.80 [†] c

[†] Desviación estándar. SB= desinfección sin bomba de vacío, CB= desinfección con bomba de vacío, NaClO= hipoclorito de sodio, MS 50 %= medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50 %, BAP= Bencilaminopurina, 2,4-D= Ácido 2,4-diclorofenolacético, PPM= *Preservative for Plant Tissue Culture*, PVP= *P Polivinilpirrolidona*, Amistar= Fungicida sistémico.

*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Corrección de Bonferroni, 0.05).

Discusión

Establecimiento *in vitro* de *M. acuminata* y *M. deliciosa*

El genotipo y el estado fenológico del material vegetal influyeron en la supervivencia y la actividad celular de los explantes establecidos. Los segmentos de hoja que se establecieron provenían de tejido maduro. Las láminas foliares de *M. acuminata*, a diferencia de las de *M. deliciosa*, presentaron las perforaciones naturales de la especie. Estas perforaciones en las láminas foliares de especies *Monstera* están asociadas con la senescencia temprana del tejido (Gunawardena et al., 2005). Según estos autores a nivel molecular la formación de las perforaciones en las hojas de *M. obliqua* se originan del proceso de muerte celular programada (PCD) temprana en el desarrollo

foliar. Este interesante comportamiento en la morfología de las hojas de *Monstera*, explica por qué los explantes de *M. acuminata* sobrevivieron menos tiempo y presentaron porcentajes más altos de oxidación y menores de actividad celular que los de *M. deliciosa*. Por otro lado, Carvajal-Guillén (2018) encontró que las hojas maduras de *M. deliciosa* presentan mayor longevidad foliar, menor amarillamiento y ausencia de daño mecánico, debido al mayor contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos en las paredes celulares, que se asocia con una mayor rigidez y persistencia.

La contaminación de los explantes depende de las defensas biológicas de las especies y el contenido de microorganismos endófitos. Pérez et al. (2009) señalan que la densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable en plantas hemiepifitas (*M. deliciosa* y *M. acuminata*) y regularmente se incrementa en plantas adultas bajo condiciones de clima cálido, en hábitat con alta diversidad y baja altitud.

El primer protocolo de desinfección resultó menos agresivo para los tejidos sin pretratamiento en bomba de vacío, por lo que sólo se realizó una inmersión en hipoclorito de sodio al 2.5% (Tabla 4), esto difiere de los resultados de Donini et al. (2005), quienes encontraron 80% de tejidos de *M. deliciosa* con una desinfección de cloro activo al 1.5%.

El medio con el conservador PPM a 1 ml/l presentó los niveles más bajos de oxidación. En este sentido, Rihan et al. (2012) determinaron que el PPM de 1 ml/l es un agente que no solo inhibe el crecimiento microbiano, sino que también mejora el desarrollo y la calidad de brotes *in vitro*. Por el contrario, el uso moderado de PVP es necesario para mejorar los porcentajes de supervivencia en explantes de hojas de caña de azúcar; Shimelis (2015) recomienda aplicar 0.2 g/l para micropropagación *in vitro* de este cultivo.

El establecimiento aséptico de los explantes de hoja fue favorable para *M. deliciosa* a diferencia de los explantes de *M. acuminata*; sin embargo, las condiciones de oscuridad fueron ideales para inducir respuestas morfogénicas (doblamiento y alargamiento) en ambas especies, comportamiento similar al encontrado *in vivo*.

Inducción de organogénesis en *M. acuminata*

La actividad celular en los discos de tallo consistió en turgencia, alargamiento y formación de callo friable. La capacidad organogénica (caulogénesis) posiblemente estuvo asociada con la edad fenológica y el estado fisiológico de los brotes seleccionados, ya que estos provinieron de plantas jóvenes en estado de prefloración (< 1 m de altura), lo que coincide con los resultados de

Tabla 4. Porcentajes de supervivencia, contaminación, actividad celular, oxidación, formación de callo y el número de brotes nuevos por tratamiento de los discos de tallo en *M. acuminata* K. a los 35 días después de la siembra. Media de mínimo 15 repeticiones. CERI-INIFAP. Chiapas, México.

Tratamiento	Super (%)	Cont (%)	A.C. (%)	Oxi (%)	Callo (%)	NBT
1. P1 + MS + BAP (1 mgL ⁻¹) + AIA (0.5 mgL ⁻¹) + ANA (0.1 mgL ⁻¹)	84.91	39.68	65.87	58.49	65.87	2
2. P1 + MS + BAP (2 mgL ⁻¹) + AIA (1 mgL ⁻¹) + ANA (0.5 mgL ⁻¹)	68.88	42.22	81.11	73.44	75.55	0
3. P2 + MS + BAP (1 mgL ⁻¹) + AIA (0.5 mgL ⁻¹) + ANA (0.1 mgL ⁻¹)	87.5	7.87	95.23	77.97	65.87	7
4. P2 + MS + BAP (2 mgL ⁻¹) + AIA (1 mgL ⁻¹) + ANA (0.5 mgL ⁻¹)	69.83	4.76	78.30	82.30	34.52	2

P1= Jabón Antibenzil al 3% + Etanol al 70 % + NaClO al 1.25% + Sol. antioxidante, P2= Tween-20 + Etanol al 20% + NaClO al 2.08% + Solución benomil + cisteína, Super= supervivencia, Cont= contaminación, A.C.= actividad celular, Oxi= oxidación, Callo = formación de callo, NBT= número de brotes nuevos por tratamiento.

los trabajos de Valderrama-Alfaro et al. (2011), quienes encontraron que la plasticidad y edad temprana del explante mejora la división celular e influye en la mayor formación de brotes.

El balance hormonal fue diferente en cada explante, ya que dependió del brote original y de la sección determinada (apical, media, basal). Chesha Desai et al. (2015) afirman que en aráceas los explantes de las partes vegetativas contienen

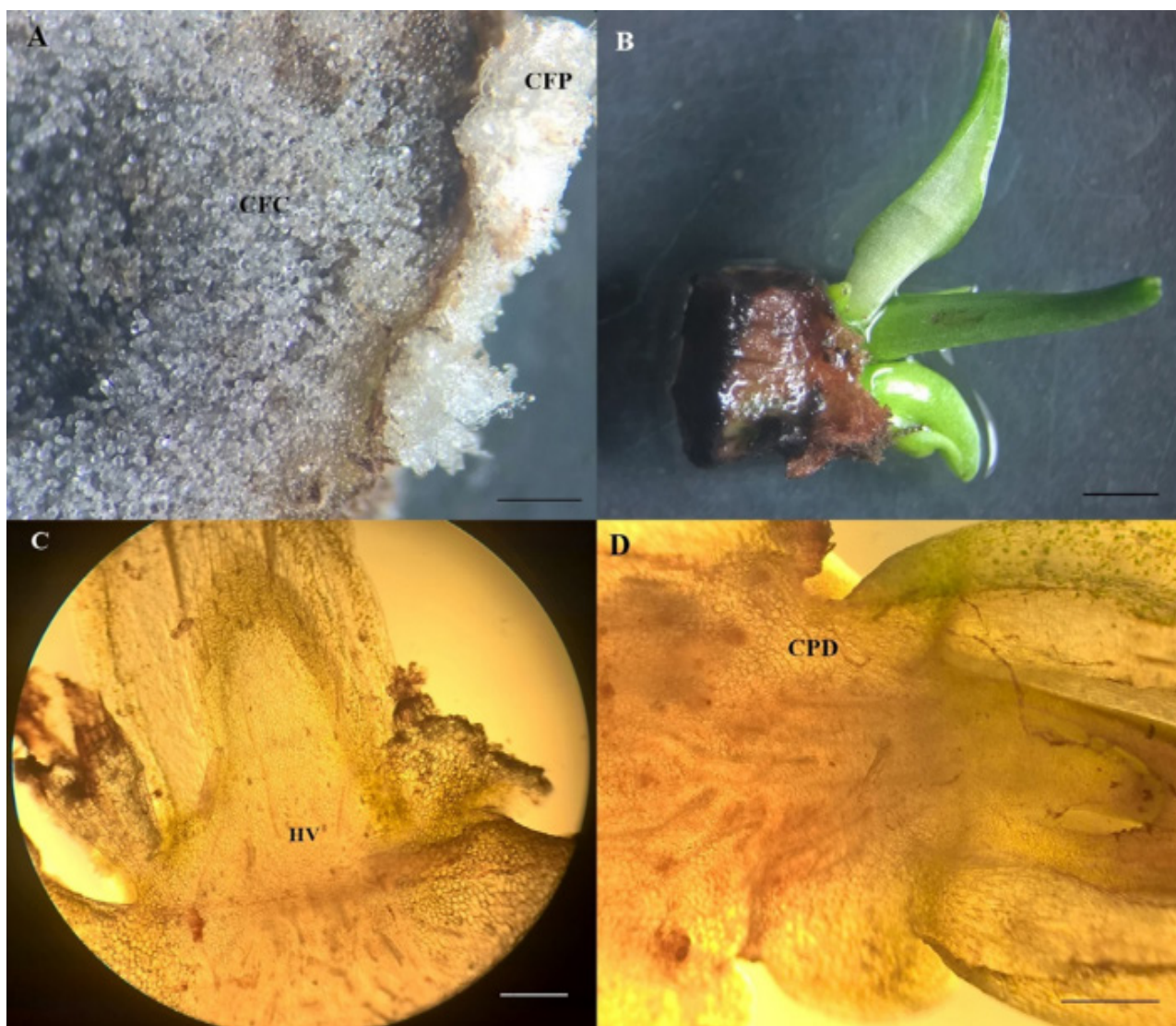


Figura 2. Discos de tallo de explantes del tratamiento 3 a 35 días de edad. CERI-INIFAP. Chiapas, México. A. El callo friable central (CFC) y el callo friable periférico (CFP) en un explante, barra= 1 mm. B) Brotes inducidos a los 45 días después de la siembra, barra= 2 mm. C) Corte histológico del brote principal, barra= 2 mm. D) Corte histológico de brote lateral, barra= 2.5 mm. HV= Haces vasculares CPD= células parénquimas del disco del tallo.

distintos niveles endógenos de reguladores de crecimiento, según su localización en la planta, lo cual explica las distintas respuestas *in vitro*, incluso en el mismo tratamiento.

La concentración exógena de reguladores del crecimiento que favoreció la formación de brotes a partir de los discos de tallo fue: BAP (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l). Lo anterior coincide con los hallazgos de Blanco y Valverde (2004), Valderrama-Alfaro et al. (2011) y Murillo-Gómez et al. (2014), quienes recomiendan el uso de BAP a 0.8 y 1 mg/l para inducir las mejores tasas de multiplicación de brotes en *Philodendron corcovadense* y en especies de *Anthurium*, respectivamente.

El mantenimiento de los discos de tallos en condiciones de oscuridad hasta 14 días favoreció la inducción de brotes en los tratamientos 1, 3 y 4, resultado similar al obtenido por Wang et al. (2015) trabajando en cultivo de fresa (95%), después de 14 días en condiciones de oscuridad.

La formación de callo tipo friable se presentó en todos los explantes de la sección apical de los tratamientos 1 y 2 y en la mayoría del tratamiento 4. En el tratamiento 3 todos los explantes de la sección basal (100 %) media (83.33%) y apical (14.29%) presentaron esta respuesta. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Valle-Sandoval et al. (2008), quienes en crisantemo obtuvieron el menor porcentaje de regeneración de brotes en la zona apical, y mayor en la zona media del disco de tallo de 1 mm de grosor.

Se observaron diferencias entre el callo friable que se originó en la parte central y en la periferia del disco del tallo (Figura 2A). Los brotes inducidos presentaron características de origen axilar 45 días después de la siembra (Figuras 2B y 2C) y de origen adventicio, ya que se observaron células parénquimas con alta actividad meristémica formando parte del brote lateral (Figura 2D).

Conclusiones

En este trabajo se logró el establecimiento aséptico de *M. acuminata* Koch y *M. deliciosa* Liebm. El mejor protocolo de desinfección para los explantes foliares fue el de una sola inmersión en NaClO al 2.5%, en el cual sobrevivieron todos los explantes del tratamiento 8 (*M. deliciosa* + MS (1 mg/l de BAP y 0.2 mg/l de 2,4-D) + 1 ml/l de PPM).

El protocolo de desinfección de brotes de *M. acuminata* más eficiente para la inducción de brotes fue: Tween-20 + Etanol al 20 % + NaClO al 2.08 % + Solución benomil + cisteína, siendo el tratamiento 3 (sembrado en medio MS

adicionados con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de AIA y 0.1 mg/l de ANA) en el que se obtuvieron los explantes con mayor brotación.

En el caso de la inducción de organogénesis a partir de discos de tallo se logró identificar condiciones y tratamientos hormonales que propiciaron inducción de brotes; no obstante, falta comprobar el origen de los mismos y desarrollar protocolos eficientes para la inducción de brotes adventicios con totipotencia celular, los cuales son ideales para la propagación *in vitro* y posteriormente en la conservación *ex situ*.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Proyecto Diseño, Equipamiento y Puesta en Marcha de un Centro Estatal de Innovación y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo de la Caficultura Chiapaneca (FOMIX#249930) del Instituto del Café del estado de Chiapas, México, y al Proyecto Multidisciplinario y Transversal Innovación Socio-ambiental en Zonas Cafetaleras para la Reducción de la Vulnerabilidad (MT#1106311262) del Colegio de la Frontera Sur, México.

Referencias

- Atak, C. y Celik, O. 2009. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. *Pakistan. J. Bot.* 41(3):115-1161.
- Blanco, M. y Valverde, R. 2004. Micropropagación de *Philodendron* sp. posiblemente *P. corcovadense*. *Agronomía Costarricense* 28:34-46.
- Carvajal-Guillén, M. J. 2018. *Determinación del estado de desarrollo óptimo para la cosecha de Monstera deliciosa, Philodendron sp. cv. Xanadú y Philodendron sp. cv. Xantal.* Universidad de Costa Rica. Tesis licenciatura. Costa Rica. 55 p.
- Chesha Desai, Rajashekhar Inghalihalli, R. Krishnamurthy. 2015. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* An- important tool in floriculture. *J. Pharmacognosy and Phytochemistry.* 4(3):112-117.
- Donini, L.P.; Ferreira-Moura, I.; Guisso, A. P.; De Souza, J. A. y Viégas, J. 2005. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Arquivos Do Instituto Biológico de Sao Paulo* 72:517-522.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Gunawardena, A. H. L. A. N.; Sault, K.; Donnelly, P. y Dengler, N. G. 2005. Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua* Araceae. *Planta* 221:607-618.
- Materán-Oviedo, M. E, Vega-Castro, M. C.; Sánchez-Olate, M. E.; Sáez, C. K. L.; Rodríguez-Fernández, R. y Ríos-Leal, D.G. 2008. Reactivación del material

- vegetal élite de *Pinus radiata* D. Don. Mediante microinjerto *in vitro*. *Interciencia*, 33 (1):66-70.
- Montes, S.; Morales, C. y Bell, E. 2004. Regeneración de plantas de *Anthurium andreanum* Lind mediante el empleo del cultivo *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 25 (3):5-7.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 5:473 - 497.
- Murillo-Gómez, P. A.; Naranjo, E.; Callejas, R.; Atehortúa, L. y Urrea, A. 2014. Micropropagation of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. for conservation purposes. *Agronomía Colombiana* 32:334-340.
- Pérez, C.A.; Rojas, J.S. y Vale, M.H. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 1:286-301.
- R Core Team 2017. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> Junio 2017.
- Reed, B.M.; Gupta, S. y Uchendu, E. 2013. *In Vitro Genebanks for Preserving Tropical Biodiversity*. En: *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer New York. New York 77 - 106.
- Rihan, H.Z.; Al-Issawi, M.; Al-Swedi, F. y Fuller, M.P. 2012. The effect of using PPM plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Scientia Horticulturae* 141:47-52.
- Shimelis, D. 2015. Effects of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal to control effect of phenolic oxidation on *in vitro* culture Establishment Stage of Micropropagation of Sugarcane *Saccharum Officinarum* L. *Journal of Applied Sciences Research* 2:52-57.
- Valle-Sandoval, M.R.; Mascorro-Gallardo, J.O. y Gil-Vázquez, I.G. 2008. Regeneración directa *in vitro* de Crisantemo, *Dendranthema X. grandiforum* kitam, a partir de segmentos de tallo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 24:219-227.
- Valderrama-Alfaro, S.; Chico-Ruiz, J.; Quispe-Chávez, J.; y Sánchez-Marín, R. 2011. Regeneración *in vitro* de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. a partir de explantes foliares. *Biotecnología Vegetal* 11(1):15-25.
- Villaseñor, J.L. 2016. Checklist of the native vascular plants of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. México. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Wang, H.; Li, M.; Yang, Y.; Dong, J. y Jin, W. 2015. Histological and endogenous plant growth regulators changes associated with adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of strawberry *Fragaria 3 ananassa* cv. 'Honeoye'. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 123:479-488.

Economic evaluation of puberty induction of nulliparous Nellore heifers using intravaginal device and melengestrol acetate

Evaluación económica de la inducción de la pubertad de novillas nulíparas de la raza Nellore con el uso de dispositivo intravaginal y acetato de melengestrol

Luiz Carlos Pereira^{*1,4}, Renan de Souza Ferreira¹, Rony Fujii Gonçalves¹, Luís Carlos Vinhas Ítavo^{3,4}, Endyara Signor Kohl^{1,4}, Alexandre Menezes Dias³, Marcos Barbosa Ferreira², Cristiano Marcelo Espínola Carvalho^{1,4}, Rodrigo Gonçalves Mateus^{1,4}

1. Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, Brasil. 2. Universidade Anhanguera - UNIDERP, Campo Grande, Brasil. 3. Universidade Federal Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Brasil. 4. Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Animal – UCDB, Campo Grande, Brasil *Author for correspondence: luizcp.agro@gmail.com.

Rec.: 2017-07-07 Acep.: 2019-07-15

Abstract

The present study evaluates the economic viability of puberty induction in nulliparous *Bos taurus indicus* Nellore breed heifers using an intravaginal device of fourth-use and melengestrol acetate (MGA[®]). The experiment was undertaken in the Nossa Senhora Aparecida Farm, Terenos city, Mato Grosso do Sul, Brazil, and was utilized a completely randomized experimental design in a 2 × 3 factorial scheme. Two age classes were included in the study, which were divided into 348 precocious (early-cycle) heifers, aging 16-18 months, weighting an average of 264.6 kg and 543 conventional-cycle heifers aging 24-26 months averaging 346.8 kg. The three treatments were as follows: control without the induction of follicle formation (treatment 1); treatment 2: induction with an intravaginal implant (intravaginal implantation with a fourth-use progesterone implant on Day 0, withdrawal on Day 12, and application of 1 ml of intramuscular estradiol cypionate [ECP[®]]); and treatment 3, 2.3 g of MGA[®] during 12 days with supplement followed by 1 ml of intramuscular ECP[®] at the end of the treatment. Heifers induced via implantation had a higher rate of ovarian activity (presence of corpus luteum) during the early cycle (63.8% animals) while the conventional cycle (72.4%). This effect influenced the frequency of early stage anestrus (56%). Among the treatments evaluated, 72% of control heifers had no ovarian activity (absence of corpus luteum). In the group with implant induction the conception rates were 65.5% and 62.4% in early and conventional-cycle females, respectively. Puberty induction in Nellore heifers provides a high economic return. The protocol revealed highest efficiency compared to the control group.

Keywords: Estrus induction, fertility, reproductive efficiency, economic return, pregnancy rate.

Resumen

En el estudio se evaluó la viabilidad económica de la inducción de la pubertad en novillas Nellore nulíparas *Bos taurus indicus* utilizando un dispositivo intravaginal de cuarto uso y acetato de melengestrol (MGA[®]). El experimento se realizó en la Hacienda Nossa Senhora Aparecida, ciudad de Terenos, Mato Grosso do Sul, Brasil, y se utilizó un diseño experimental completamente al azar en un esquema factorial de 2 × 3. Se incluyeron animales en dos grupos de desarrollo: novillas precoces (ciclo temprano), con edades entre los 16 y los 18 meses, con un promedio de 264,6 kg; y 543 novillas de ciclo convencional con edades entre 24 y 26 meses y un promedio de peso vivo de 346,8 kg. Los tratamientos fueron: control sin la inducción de formación de folículos (tratamiento-1); tratamiento-2 consistente en inducción con un implante intravaginal (implante de progesterona de cuarto uso) en el día 0, retiro el día 12 y aplicación de 1 ml de cipionato de estradiol intramuscular [ECP[®]]; y tratamiento-3 consistente en 2,3 g de MGA[®] durante 12 días con suplemento seguido de 1 ml de ECP[®] intramuscular al final del tratamiento. Las novillas inducidas a través de la implantación tuvieron una mayor tasa de actividad ovárica (presencia de cuerpo lúteo) durante el ciclo temprano (63.8% animales) y en el ciclo convencional (72.4%). Este efecto influyó en la frecuencia de los estadios en etapa temprana (56%). Entre los tratamientos evaluados, el 72% de las novillas de control no presentaban actividad ovárica (ausencia de cuerpo lúteo). En el grupo con inducción de implantes, las tasas de concepción fueron de 65.5% y 62.4% en novillas de ciclo temprano y convencional, respectivamente. La inducción a la pubertad en novillas Nellore proporciona un alto rendimiento económico. El protocolo reveló una mayor eficiencia de este tratamiento en comparación con el grupo control.

Palabras clave: Inducción del estro, fertilidad, eficiencia reproductiva, retorno económico, tasa de preñez.

Introduction

Brazil is one of the largest producers and exporters of beef in the world (ABIEC, 2019). Although in recent years, beef exports have been significant and of great economic importance, cattle increasingly compete for physical/economic space with agricultural crops (Lima et al., 2013). With the economic globalization of agribusiness (Silva et al., 2009) the production of cattle in Brazil needs to establish production systems that can efficiently produce quality meat at low prices (Euclides et al., 2001). In addition, these systems must be competitive, sustainable, and able to produce early animals. Given these challenges, knowledge on reproduction, genetics, and drugs has been applied to increase the efficiency of artificial insemination (AI) and the use of AI protocols of a fixed time (AIFT). This has resulted in increased efficiency in the use of reproductive animal husbandry, which is an important tool for genetic improvement and increased productivity (Neri et al., 2015). Valle (2011) reported that reproduction was the basis for increasing zootechnical indexes. According to Sá Filho et al. (2009), production modern livestock require the use of reproductive indexes (such as pregnancy rate, service index, birth interval, and birth rate) to plan this activity within the farm.

A heifer reaches puberty once gametes are released and when all stages of sexual behavior are established (Hafez and Hafez, 2004). Reproductive characteristics have been sought to reduce the age of first calving to optimize the reproductive performance of females (Silva et al., 2005). According to Freitas et al. (2011), this physiological condition is influenced by the weight of the animals. In this sense, AIFT allows the synchronized induction of ovulation in heifers at predetermined times, reducing the interval between births, and allowing the conception and concentration of mating services and births to be planned (Bó et al., 2003; Neri et al., 2015).

Gottschall et al. (2012) noted that the success of ovulation synchronization with AIFT in cut matrices depended on the efficacy of the protocols employed and the application of drugs. However, results have been associated with management, body condition score, and previous knowledge on the physiological status of the animals for the implementation of AIFT and subsequent biotechnological success (Maziero et al., 2012). Thus, the most frequently applied AIFT protocols in beef cattle are associated with intravaginal devices containing progesterone, estradiol, and prostaglandin (PGF_{2α}), as well as protocols associated with the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and PGF_{2α} called Ovsynch (Bó

et al., 2002). In addition, progesterone can be administered orally (melengestrol acetate, MGA) or via subcutaneous implants (norgestomet) (Stevenson et al., 2003; Borges and Macedo, 2003; Rodrigues, 2016).

Oral MGA helps to prevent the occurrence of premature luteolysis, or short cycles (Sá Filho, 2007), by increasing the fixation of the corpus luteum and enhancing conception rates (Wood-Follis et al., 2004). In addition to stimulating follicular development, it allows greater efficiency of GnRH in the protocol (Meneghetti et al., 2001).

Based on a study by Valle (2011) anticipation of age at first calving and shorter calving intervals were found to be fundamental for increasing the rate of return on capital, as well as promoting efficiency in the use of pasture with early identification of unproductive animals. However, the costing and determination of profitability represent challenges that must be overcome for agricultural companies to be competitive (Cogan, 1999). The cost of using biotechnology and drugs to increase the pregnancy rate of bovine females is fundamental for evaluating the financial impacts of each activity involved in the rural enterprise. By utilizing economic results, the producer can consciously make decisions and view their production system as a company (Lopes and Carvalho, 2002).

The objective of the present study was to evaluate the induction of puberty in precocious (early-cycle) and conventional-cycle *Bos taurus indicus* Nellore breed heifers using an intravaginal device and MGA to determine the economic viability of these techniques.

Material and methods

The experiment was carried out at Nossa Senhora Aparecida Farm (20.43°S, 55.28°W), municipality of Terenos, Mato Grosso do Sul, Brazil, on 891 nulliparous Nellore heifers from July 17, 2015 to September 16, 2015. The animals were maintained in pastures of *Urochloa brizantha* cultivar Marandu with a protein mineral supplement supplied *ad libitum* (Table 1). All animals were previously identified and evermined, and the groups were homogenized to determine the body condition score (BCS) of the groups, using the scale of 1 to 5 as proposed by Edmonson et al. (1989).

The experimental design was completely randomized in a 2 × 3 factorial scheme and included two age classes with 348 precocious (early) cycle (16-18 months) heifers with an average weight of 264.6 kg and 543 conventional-cycle (24-26 months) heifers with a mean

Table 1. Guarantee levels per kg of protein mineral supplement of Nelore heifers treated with artificial insemination of a fixed time (AIFT)

Nutrients	Quantity	Nutrients	Quantity
NNP Eq Proteico (máx.)	168.00 g	Covers (min.)	400.00 mg
Calcium (mín.)	150.00 g	Manganese (min.)	455.00 mg
Calcium (máx.)	180.00 g	Zinc (min.)	1,876.00 mg
Phosphorus (mín.)	65.00 g	Organic chrome (min.)	2.50 mg
Magnesium (mín.)	2,500.00 mg	DBR probiotic (min.)	500 g
Sulfur (mín.)	6,200.00 mg	Magnesio quelatado (min.)	150.00 mg
Sodium (mín.)	116.00 g	Chelated copper (min.)	22.00 mg
Selenite (mín.)	5.00 mg	Chelated iron (min.)	4,000.00 mg
Iodo (mín.)	30.00 mg	Selenium chelated (min.)	0.20 mg
Cobalt (mín.)	30.00 mg	Chelated zinc (min.)	120.00 mg

Basic composition of product: Starea® 200 S, urea, calcium carbonate, di-calcium phosphate, common salt, sulfur, magnesium oxide, calcium iodate, zinc oxide, sodium selenite, cobalt sulfate, copper sulfate, manganese sulfate, chelated minerals, organic chromium, DBR (ruminal bacteria), palatibilizer. Estimated consumption 100 to 120 g per animal per day.

weight of 346.8 kg. The three treatments were as follows: treatment-1, control without the induction of follicle formation (116 heifers in the early cycle and 181 in the conventional cycle); treatment-2, induction with an intravaginal implant reused by fourth time (intravaginal implant of progesterone inserted on day 0 (D0) and removed on day 12 (D12), when 1 ml of intramuscular estradiol cypionate [ECP®] was administered] having 116 heifers in the early cycle and 181 in the conventional cycle; and treatment-3, MGA induction protocol with 2.3 g/day supplied for 12 days, and at the end of the treatment, 1 ml of intramuscular ECP® was administered (116 heifers in the early cycle and 181 in the conventional cycle).

After 10 days of induction treatment, all flock, including the control group, were subjected to the AIFT protocol, with the first day of the protocol considered as D0. Animals received a used intravaginal progesterone implant (fourth use) and were administered 2 ml of estradiol benzoate (Estrogin® 5 mg, Biofarm, tecnologia em veterinária, Brasil) intramuscularly. The second treatment was administered on day 7 (D7) and included 2.5 ml of intramuscular prostaglandin analogue (Lutalyse®, dinoprost trometamine, 6.71 mg (equivalent to 5mg/mL of dinoprost), Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Brasil). On day 9 (D9), the intravaginal implants were removed and 0.3 ml of intramuscular estradiol cypionate (ECP®, 2 mg, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Brasil) and 1.5 ml of

eCG (Novormon®, equine chorionic gonadotropin, 200 UI (eCG, PMSG), Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Brasil) were applied. On day 11 (D11) the heifers were submitted to artificial inseminating (AI) using commercial Angus bull semen mechanically deposited in the female reproductive system with a universal bovine applicator. The AIFT design rate (% of heifer pregnant/total heifer inseminated at a fixed time) was determined via the confirmation of gestation by ultrasonography after 30 days following AI.

The methodology utilized in the present study to calculate production costs expressed in American Dollars (US\$) was via the division of effective operational cost, total operational cost (TOC), and total cost (TC) based on the method described by Hoffmann et al. (1987). The costs were determined based on disbursements made during the 60-day production cycle. Costs were allocated in amounts spent per animal and classified as supplementation, labor, rent, health, maintenance, capital invested, capital interest, and working capital interest considering the expenditures of the technique of synchronization of ovulation and AI at a fixed time in each group, expenditure on hormones, staff displacement, value of semen doses, labor costs for insemination, and diagnosis of gestation. The classification of costs allowed for the identification of results and profitability indicators, which served as the basis for the analysis of the second production methodologies defined by Lazzarini Neto (1995). Total revenue (TR) was defined as the sale of pregnant females at the fixed value of 15 @, for example, if the heifer was pregnant and weighing 368 kg of BW, it was considering having 15 @ and empty females at the market value, gross margin (GM) = (TR - TOC), economic profitability (EP) = (TR - TC), profitability was attributed to the division of EP by TC, and the profitability and result of the division of EP was divided by the total investment.

Economic data were tabulated in a Microsoft Excel® program for economically viable results. During economic evaluation, the biological data obtained (pregnancy rate) were used for each experimental group, comparing the values of the results.

Cross-reference tests of independent samples were performed, crossing the tables of the collected variables. After these preliminary tests the more adjusted tests were performed, so for the biological data of gynecological diagnosis and diagnosis of pregnancy were submitted to chi-square tests ($P < 0.05$) and Pearson's correlations, for initial weight the data were submitted to analysis of variance ($P < 0.05$) and, in the case of a significant difference in 'F' test results, the statistical program SAS version 9.1 (2004) was applied.

Results

Significant difference ($P < 0.05$) was observed only for weight among the different female age classes. These differences were related to the age of the animals. Regarding the different treatments, there was no significant differences ($P > 0.05$) in weight (Table 2). The gynecological diagnosis and pregnancy of heifers revealed a significant difference ($P < 0.05$) among treatments (Tables 3 and 4).

Heifers induced via implantation had a higher rate of ovarian activity (presence of corpus luteum) during the early cycle (63.8%) and conventional cycle (72.4%) than the other treatment groups, with the highest index of females in the cycle depending on the physiological age of the animals. This effect influenced the frequency of early stage anestrus (56%). Among the treatments, 72% of control heifers had no ovarian activity, which was determined by the absence of the corpus luteum.

Higher conception rates were observed for heifers induced via implantation, at 65.5% and 62.4% for females in the early-cycle and conventional-cycle groups, respectively. This was also observed with MGA, where obtained conception rates for precocious females were 52.6% and conventional females were 55.8% (Table 3). There were differences among the capital interest costs in conventional-cycle heifers than in early-cycle heifers, with the former presenting a value 31.01% higher than the latter (Table 5).

The economic feasibility analysis per animal identified an effective operational cost with higher value when using the implant induction protocol. The animals in the control group cost US\$ 46.57 and those treated with MGA cost US\$ 47.65 during the experimental period, i.e., with the use of only the AIFT protocol, there was a reduction of 16.61% in the effective operational cost per animal. When the results of the treatment with MGA were compared, the reduction was 13.96% among treatments (Table 6).

The results for the production systems were also significant for TC, with the early-cycle heifers being 21.46% lower than the conventional-cycle heifers, which presented a value of US\$ 528.85. This difference is associated with a higher investment cost for conventional-cycle animals (Table 5).

Discussion

From the results of the present study, it can be inferred that the induction protocol with the fourth-use implant and MGA before AIFT were superior to the control treatment, being 23.28% and 11.03%, respectively. This can be attributed to elevated exogenous progesterone (P4) rates, which possibly reduced the occurrence of premature luteolysis or short cycles (Sá Filho, 2007), inhibited luteinizing hormone secretion during induction, and suppressed follicular growth (Dogi, 2005) in females containing a corpus luteum. However, the early conception

Table 2. Weight and N of nulliparous females submitted for follicular and AIFT inductions

Variables	Early Cycle			Conventional Cycle			P1	P2
	Control	Implant	MGA	Control	Implant	MGA		
N	116	116	116	181	181	181		
Weight	264.75b	265.03b	264.14b	348.68a	345.03a	346.71a	0.001	0.104

P1-effect between classes. P2-treatment effect; Averages within the same line with different lowercase letters were significant for class effect by the F Test ($P < 0.05$).

Table 3. Gynecological diagnosis and pregnancy of nulliparous females submitted to follicular and AIFT inductions

Variables	Early Cycle			Conventional Cycle			P1	P2
	Control	Implant	MGA	Control	Implant	MGA		
Gynecological diagnosis								
Presence of corpus luteum	32c	74a	47b	100b	131a	114ab	0.475	0.017
Absence of corpus luteum	84c	42b	69a	81c	50b	67a	0.924	0.001
Prenatal diagnosis								
Positive pregnancy	54b	76a	61ab	91b	113a	101ab	0.965	0.001
Negative pregnancy	62a	40b	55a	90a	68b	80a	0.707	0.001

P1-effect between classes; P2-treatment effect; The same line averages with different letters represent significant treatment effects by chi-square test ($P < 0.05$).

Table 4. Pear correlation between the average weight in kg (weight), body condition score (BCS), diagnosed presence of corpus luteum (CL), and diagnosis of pregnancy (Pregnancy) of nulliparous females submitted to follicular and AIFT inductions

	Pregnancy	Weight	BCS	CL
Control				
Pregnancy	1	0.002	-0.045	-0.006
Weight	0.001	1	0.388**	0.295**
BCS	-0.045	0.388**	1	0.236**
CL	-0.006	0.295**	0.236**	1
Implant				
Pregnancy	1	0.004	-0.022	0.008
Weight	0	1	0.468**	0.109
BCS	-0.022	0.468**	1	-0.013
CL	0.008	0.109	-0.013	1
MGA				
Pregnancy	1	0.049	0.011	0.057
Weight	0.049	1	0.396**	0.298**
BCS	0.011	0.396**	1	0.137*
CL	0.057	0.298**	0.137*	

** The correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * The correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Table 5. Center costs (USD) for nulliparous Nellore females submitted to follicular and AIFT inductions

Variables (US\$ animal ⁻¹)	Early cycle			Conventional cycle		
	Con-trol	Im-plant	MGA	Con-trol	Im-plant	MGA
Price kg	2.76	2.76	2.76	2.76	2.76	2.76
Pharmaceuticals	0.00	7.74	1.08	0.00	7.74	1.08
Semen	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64
Supplementa-tion	26.63	26.63	26.63	26.63	26.63	26.63
Labor	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79
Vacation Rentals	7.74	7.74	7.74	7.74	7.74	7.74
Sanity	1.86	1.86	1.86	1.86	1.86	1.86
Maintenance	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Invested capital	365.98	366.37	365.14	482.00	476.95	479.28
Capital interest (\$)	7.36	7.37	7.34	9.69	9.59	9.63
Working capital interest	0.93	1.09	0.96	0.93	1.09	0.96

Table 6. Viability of economic indicators (USD) of the nulliparous Nellore females submitted to follicular and AIFT inductions

Variables	Early Cycle			Conventional Cycle		
	Control	Implant	MGA	Control	Implant	MGA
Effective operational cost	46.57	54.31	47.66	46.57	54.31	47.66
Total operating cost	412.55	420.68	412.79	528.57	531.27	526.93
Cost of capital (\$)	8.29	8.46	8.30	10.63	10.68	10.59
Total cost	420.84	429.13	421.09	539.20	541.94	537.52
Total revenue	622.06	622.06	622.06	622.06	622.06	622.06
Gross margin	209.51	201.38	209.27	93.49	90.79	95.13
Economic outcome (\$)	201.22	192.93	200.97	82.86	80.11	84.54
Leveling Price (\$)	399.80	407.68	400.03	512.24	514.85	510.65
Batch costing of females with positive pregnancies						
Pregnancy rate	46%	66%	53%	51%	62%	59%
Total cost (\$)	22,724.68	32,610.53	25,683.35	49,060.74	61,238.79	61,238.79
Number of positive animals	54	76	61	91	113	101
Total revenue (\$)	33,589.94	47,271.24	37,941.11	56,600.34	70,291.58	37,941.11
Profit (%)	32.35%	31.01%	32.31%	13.32%	12.88%	13.59%
Profitability (%)	54.29%	52.00%	54.35%	17.03%	16.64%	17.47%
Batch costing of females with negative pregnancies						
Total cost (\$)	26,093.11	17,168.94	23,162.88	48,533.72	36,853.13	36,853.13
Number of negative animals	62	40	55	90	68	80
Total revenue (\$)	25,005.50	16,150.93	22,138.10	46,744.89	34,971.70	34,971.70
Profit (%)	-4.35%	-6.30%	-4.63%	-3.83%	-5.38%	-4.05%
Profitability (%)	-4.25%	-6.05%	-4.51%	-3.76%	-5.21%	-3.97%
Economic feasibility of experimental batch						
Total group cost (\$)	48,817.77	49,779.47	48,846.22	97,594.46	98,091.92	97,291.70
Total group revenue (\$)	58,595.42	63,422.17	60,079.23	103,345.20	105,263.28	104,155.67
Economic return group (\$)	9,777.65	13,642.71	11,232.98	5,750.75	7,171.35	6,863.95
Economic return animal (\$)	39.24	77.05	50.92	15.97	24.73	21.16
Lot profitability (%)	16.69%	21.51%	18.70%	5.56%	6.81%	6.59%

indexes of females were higher than the proportion of animals with ovarian activity. According to Baruselli et al. (2002), implantation of the P4 implant on D0 together with the benzoate of estradiol induced a new follicular wave, favoring animals in anestrus.

In the present study, there were no differences between the conception rate associated with BCS, since 91.1% of heifers in the early-cycle group had BCS level 3 and the conventional-cycle group presented only 1.7% of BCS level 2 (Figure 1). Gottschall et al. (2012) found that animals with a BCS above level 2.5 had a higher rate of conception. This was also reported by Sá Filho et al. (2009) who showed that for AIFT to obtain a minimum of 40% positive pregnancies, the mothers submitted to the protocol must have an BCS score above level 2.5.

From the results observed in the present study, the pregnancy rate following induction with the fourth-use implant was positively influenced by the weight and BCS of the heifers. According to Wheaton and Lamb (2007), intravaginal progesterone implants in animals with adequate BCS stimulates estrus, increasing conception rates.

However, under both the control and MGA induction treatments, the presence of the corpus luteum can be inferred as a response factor for the pregnancy rate (Table 4). The negative relationship between pregnancy rate and the presence of the corpus luteum is possibly related to the morphology or physiological status of the follicles (Peter et al., 2009). Rhodes et al. (2003) noted that the subluteal concentration of progesterone influenced the response in acyclic and cyclic animals. This is because AIFT in animals with small follicles reduces reproductive efficiency, which probably results in the formation of a smaller corpus luteum due

to lower concentrations of progesterone (Burke et al., 2001). With MGA induction, the dominant follicle was maintained. Cerri et al. (2009) reported that the use of exogenous progesterone might stimulate ovulation and corpus luteum formation in animals with dominant follicles above 10 mm in diameter.

The income values of animals with positive pregnancies were the same because the sale of animals occurred with pregnant females having a value fixed at 15 @ for animals (in Brazil it is used trade live animals using the arroba (@) index, so considering 50% of carcass yield one animal having 15 @ will weight 450 kg of live body weight). Revenue values for non-pregnant females from the conventional cycle were obtained when the animals were sold for slaughter, presenting an average value of US\$ 516.99, and females from the early cycle were sold for termination with an average income of US\$ 403.14 per animal.

When evaluating the profitability of pregnant females, the highest rate was observed for early-cycle animals (53.54%). Although females with a conventional cycle presented lower results, the values obtained were satisfactory when compared to fixed yield financial investments in the market. The profitability of nonpregnant females was unsatisfactory over the experimental period owing to the relationship between the production costs and revenue obtained during this period.

However, the results showed a higher economic return per animal with the use of implant induction, at US\$ 77.04 and US\$ 24.73 for females in the early and conventional-cycle groups, respectively, considering the average results for the experimental lots. With the reduced conception rate in the control group of the early and conventional-cycle groups, the economic return was reduced by 49.07 and 35.42%, respectively.

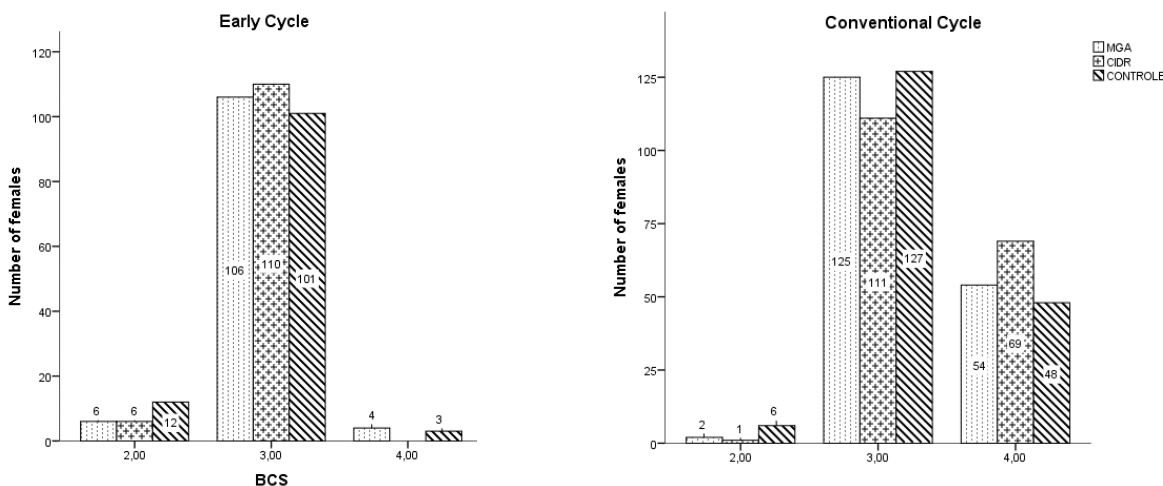


Figure 1. Relationship between body condition score (BCS) of nulliparous Nellore female early-cycle classes (left) and conventional-cycle classes (right).

Thus, the results of average batch profitability with implant induction were superior to that with the MGA (18.70%) and control (16.69%) treatments for the early-cycle animals. This was observed for animals in the conventional cycle and animals with implant induction, with above average profit per batch.

Regarding the production cycles, the profitability of the early-cycle animals was 12.61% higher than that of conventional-cycle animals. Therefore, the use of females aged 16-18 months in AIFT under conditions of forage and supplementation that are equivalent to the requirement of their nutritional needs provides a higher remuneration of capital for agricultural enterprise not only when the short cycle of livestock is used, when the animals for sale stay for a short time in the property. Thus, the definition of production and reproduction objectives involves establishing strategies for the rational use of breeding biotechnologies to determine the economic return of livestock activity at short time. Hormone therapy, when appropriately applied, contributes to increased reproductive efficiency and a favorable cost-benefit ratio to the producer (Sá Filho, 2007).

Conclusion

It was concluded that the induction of precocious heifers provided a higher pregnancy rate, was a preponderant factor in animal production systems, and increased the economic return compared to conventional-cycle animals. An induction protocol that utilizes reused implants is recommended for groups of heifers in early and conventional cycles by virtue of obtaining a higher AIFT pregnancy rate and profitability compared to MGA and control groups.

References

- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes ABIEC. 2019, Beef Report. São Paulo: ABIEC. 49p. Retrieved from: <http://www.abiec.com.br/controle/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>
- Baruselli, P. S.; Marques, M. O.; Carvalho, N. A. T.; Madureira, E. H. and Campos Filho, E. P. 2002. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26(3):218-221. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/277020350_Efeito_de_diferentes_protocolos_de_inseminacao_artificial_em_tempo_fixo_na_eficiencia_reprodutiva_de_vacas_de_corte_lactantes
- Bó, G. A.; Baruselli, P. S. and Martinez, M. F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78(3):307-326. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00097-6)
- Bó, G. A.; Baruselli, P. S.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; Tribulo, R. and Mapletoft, R. J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1):53-72. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00097-6)
- Borges B. S. J. and Macedo G.R. 2003. Indução da atividade cíclica ovariana pós-parto em vacas de corte submetidas à interrupção temporária do aleitamento associada ou não ao tratamento com norgestomet-estradiol. *Ciência Rural*, 33(6):1105-1110. Retrieved from: <http://www.scielo.br/pdf/00D/cr/v33n6/a16v33n6.pdf>
- Burke, C. R.; Mussard, M. L.; Grum, D. E. and Day, M. L. 2001. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. *Animal Reproduction Science*, 66(3):161-174. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00101-4)
- Cerri, R. L.; Rutigliano, H. M.; Bruno, R. G. S. and Santos, J. E. 2009. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Animal Reproduction Science*, 110(1):56-70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.005>
- Cogan, S. 1999. Custos e preços: formação e análise 1ª Ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning. 157p.
- Dogi, F. 2005. Manejo farmacológico del ciclo estral del bovino. Retrieved from: <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- Edmonson, A. J.; Lean, I. J.; Weaver, L. D.; Farver, T. and Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1):68-78. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)
- Euclides, V. P. B.; Euclides Filho, K.; Costa, F. P. and Figueiredo, G. R. D. 2001. Desempenho de novilhos F1s Angus-Nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(2):470-481. Retrieved from: <http://www.scielo.br/pdf/00D/rbz/v30n2/5490.pdf>
- Maziero, R. R. D.; Martin, I. Mattos, M. C. C. and Ferreira, C. P. 2012. Plasma concentration of progesterone and cortisol in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) submitted to dail. *Veterinária e Zootecnia*, 19(3):366-372. Retrieved from: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141261/ISSN2178-3764-2012-19-03-366-372.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Freitas, A. R.; Souza, J. F. and Moreira, A. 2011. Predição da precocidade sexual em bovinos da raça Nelore por meio de componentes principais. *Revista de Ciências Agrárias*, 54 (2):153-158. Doi: <https://doi.org/10.4322/rca.2012.009>
- Gottschall, C. S.; Almeida, M. R.; Tolotti, F.; Magero, J.; Bittencourt, H. R.; Mattos, R. C. and Gregory, R. M. 2012. Avaliação do desempenho reprodutivo de vacas de corte lactantes submetidas à IATF a partir da aplicação do GnRH, da manifestação estral, da reutilização de dispositivos intravaginais e da condição corporal. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(1):1012-1021. Retrieved from: <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289021814003.pdf>

- Hafez, E. S. E. and Hafez, B. 2004. *Reprodução Animal* 7ª ed. Barueri: Manole. 509p.
- Hoffmann, R.; Engler, J. J. C. and Serrano, O. 1987. *Administração da empresa agrícola* 3ª Ed. São Paulo, SP: Pioneira. 325p.
- Lazzarini Neto, S. 1995. *Controle da produção e custos* 1ª Ed. São Paulo: SDF Editores. 63p.
- Lima de, C. E.; Martins, T. C.; Soldado, G. V. and dos Santo Silva, R. 2013. Caracterização das exportações e da competitividade internacional do complexo de carnes brasileiro. Santa Catarina: Apec Unesc. Retrieved from: http://www.apec.unesc.net/VI_EEC/sessoes_tematicas/Tema11-Economia_e_Relacoes_Internacionais/Artigo-6-Autoria.pdf.
- Lopes, M. A. and Carvalho, F. D. M. 2002. *Custo de produção do gado de corte*. Lavras: UFLA, (Boletim Agropecuário 33). 48p.
- Meneghetti, M.; Vilela, E. R.; Vasconcelos, J. L. M.; Cerri, R. and Ferreira Jr, N. 2001. Efeito da remoção dos bezerros nos folículos dominante e na taxa de ovulação ao primeiro GnRH em protocolos de sincronização em vacas Nelore em anestro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25(3):286-288. Retrieved from: https://www.researchgate.net/profile/Carlos_De_Lima2/publication/285055333_CHARACTERIZACAO_DAS_EXPORTACOES_E_DA_COMPETITIVIDADE_INTERNACIONAL_DO_COMPLEXO_DE_CARNES_BRASILEIRO/links/565b3e7f08aeaf2aac6114c.pdf
- Neri, H. L. D.; Fernandes, C. A. C.; Palhão, M. P.; Rossi, J. R. and Varago, F. C. 2015. Serum progesterone in heifers with different luteal activity treated with vaginal devices. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(2):405-410. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7441>
- Peter, A. T.; Vos, P. L. A. M. and Ambrose, D. J. 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, 71(9):1333-1342. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.012>
- Rhodes, F. M.; McDougall, S.; Burke, C. R.; Verkerk, G. A., and Macmillan, K. L. 2003. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrus interval. *Journal of Dairy Science*, 86(6):1876-1894. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73775-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73775-8)
- Rodrigues, A. D. P. 2016. *Desempenho reprodutivo em novilhas Bos indicus e Bos taurus X Bos indicus submetidas a protocolos de sincronização da ovulação*. 86p. Tese Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. Available in: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/148021/rodrigues_adp_dr_bot.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Sá Filho, O. G. 2007. *Efeito de tratamentos com progesterona e/ou estradiol na incidência de regressão prematura do corpo lúteo após a primeira ovulação em vacas nelore pós-parto*. 136 P. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. Retrieved from: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98241/safilho_og_me_botfmvz.pdf?sequence=1
- Sá Filho, O. G.; Meneghetti, M.; Peres, R. F. G.; Lamb, G. C. and Vasconcelos, J. L. M. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, 72(2):210-218. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.008>
- SAS. SAS/STAT User's Guide: version 9.1. North Caroline, SAS Institute, 2004. 5136p
- Silva, F. D.; SÁ, J. D.; Schio, A. R.; Ítavo, L. C. V.; Silva, R. R. and Mateus, R. G. 2009. Suplementação a pasto: disponibilidade e qualidade x níveis de suplementação x desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1):371-389. Retrieved from: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Carlos_Itavo/publication/262521689_Grazing_supplementation_Availability_and_quality_x_supplementation_levels_x_performance/links/0deec53ac2bc78f2bd000000/Grazing-supplementation-Availability-and-quality-x-supplementation-levels-x-performance.pdf
- Silva, J. A. I.; Dias, L. T. and Albuquerque, L. G. D. 2005. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(5):1568-1572. Retrieved from: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/4744>
- Stevenson, J. S.; Lamb, G. C.; Johnson, S. K.; Medina-Britos, M. A.; Grieger, D. M.; Harmony, K. R. and Marple, T. J. 2003. Supplemental norgestomet, progesterone, or melengestrol acetate increases pregnancy rates in suckled beef cows after timed inseminations. *Journal of Animal Science*, 81(3):571-586. Doi: <https://doi.org/10.2527/2003.813571x>
- Valle, E. D. 2011. *Boas práticas agropecuárias: bovinos de corte: manual de orientações* 2ª Ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 69p.
- Wheaton, J. E. and Lamb, G. C. 2007. Induction of cyclicity in postpartum anestrus beef cows using progesterone, GnRH and estradiol cypionate ECP. *Animal Reproduction Science*, 102(3):208-216. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.11.006>
- Wood-Follis, S. L.; Kojima, F. N.; Lucy, M. C.; Smith, M. F. and Patterson, D. J. 2004. Estrus synchronization in beef heifers with progestin-based protocols: I. Differences in response based on pubertal status at the initiation of treatment. *Theriogenology*, 62(8):1518-1528. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.017>

Yield and popping expansion components in local popcorn varieties from Southern Brazil

Componentes de rendimiento y capacidad de expansión de variedades locales de maíz pira en el sur de Brasil

¹Gabriel Moreno Bernardo Gonçalves, ¹Luana Burg Mayer, ²Rosenilda de Souza and ²Juliana Bernardi Ogliari

1. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brazil. 2. Universidade Federal de Santa Catarina.

*Author for correspondance: gabriel.agrobio@gmail.com

Rec.: 2017-11-30 Acep.: 2019-07-15

Resumen

En el presente trabajo se evaluaron la productividad de granos (GY), la capacidad de expansión (PE), la capacidad de expansión sin el peso de los granos no reventados (PEW), además de otras 11 características agronómicas y morfológicas de 14 variedades locales de maíz (*Zea mays* L.) ‘pira’ (LPV) provenientes del extremo oeste de Santa Catarina, en el sur de Brasil. Utilizando un delineamiento experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones se realizaron dos experimentos, en dos regiones diferentes del estado de Santa Catarina; un primer ensayo en Florianópolis (litoral este) y un segundo ensayo en el municipio de Anchieta (extremo oeste). La mayor correlación positiva se observó entre productividad y prolificidad (PRL) ($r = 0.72$) seguida de la productividad vs. el número de granos por fila (NGR) ($r = 0.71$), mientras que con el índice de circularidad de la cariósida (CCI) la correlación fue negativa ($r = -0.67$). La variable (PEW) mostro correlación positiva con CCI ($r = 0.70$) y con la relación espesor/largo (TWR) ($r = 0.70$). La variedad de maíz pira 574A se destacó por sus altos valores de PE y PRL. El mejoramiento de poblaciones compuestas y de poblaciones *per se* es una estrategia de selección potencial para LPV, basada en la complementariedad y correlación entre las variables y los valores de GY, PE, PEW, TWR CCI – HEP – relación entre altura de la primera mazorca/altura de la planta; PH – altura de la planta; PRL – WHG – peso de 100 gramos; VHG - volumen de 100 gramos; EL – longitud de la mazorca; NRE – número de filas por mazorca; NGR – ED – diámetro de la mazorca.

Palabras clave: Agrobiodiversidad; correlación fenotípica; potencial genético; premejoramiento; variedades criollas; *Zea mays* L.

Abstract

The aim of this study was to evaluate grain yield (GY), popping expansion (PE), popping expansion disregarding the weight of unpopped kernels (PEW), and eleven other agronomic and morphological traits of 14 local popcorn varieties (LPV) from far west of the state of Santa Catarina, Southern Brazil. Two experiments were carried out, in a completely randomized block design with three replications, in different regions of Santa Catarina: one in the municipality of Florianópolis (east coast) and the other in Anchieta (western). Grain yield had the highest positive correlation with prolificacy (PRL) ($r = 0.72$) and number of grains per row (NGR) ($r = 0.71$), and a negative correlation with caryopsis circularity index (CCI) ($r = -0.67$). Variable PEW showed a positive correlation with CCI ($r = 0.70$) and with thickness/width ratio (TWR) ($r = 0.70$). Variety 574A stood out for high PE and PRL. The improvement of composite populations and of populations *per se* is a potential breeding strategy for LPV, based on the complementarity and correlation among variables and the GY, PE, and PEW values, CCI – HEP – first ear height/plant height relation, PH – plant height; PRL – WHG – weight of 100 grains; VHG - volume of 100 grains; EL – ear length; NRE – number of rows per ear; NGR – number of grains per row of ear; ED – ear diameter.

Key words: Agrobiodiversity; Genetic potential; Landrace; Phenotypic correlation; Pre-breeding; *Zea mays* L.

Introduction

In recent years, Brazil has stood out as one of the biggest popcorn producers in the world. Although this crop has achieved high national relevance, official information is still inexistent in terms of growing area, production, and grain yield.

One of the weak points of the popcorn production chain in Brazil is the low market availability of national cultivars, that are qualitatively superior and adapted to different regions of the country. This lack of options has been responsible for the dependency of the national production system on the packing companies, which own the seed registrations (Cruz, Filho and Queiroz, 2014).

Because of its use for human consumption, popcorn must primarily possess good popping expansion (PE). However, PE is related to various other factors, such as genetics, production, harvest, processing, drying, pericarp and endosperm conditions, and grain size, shape, and moisture content (Lyerly, 1942; Miranda, Souza, Galvão, Guimarães, Melo and Santos, 2008). Besides these attributes, popcorn must have a good grain yield (GY), which in turn is commonly correlated with prolificacy (PRL), number of rows per ear (NRE), number of grains per row (NGR), ear length (EL), and ear diameter (ED) and negatively correlated with PE (Broccoli and Burak, 2004, Miranda, Souza, Galvão, Guimarães, Melo and Santos, 2008, Vidal-Martínez, Clegg, Johnson and Valdivia-Bernal, 2001).

The far west region of Santa Catarina State features a broad genetic diversity of *Zea mays* L. local varieties and wild relatives, and it has thus been indicated as a microcenter of diversity for the genus *Zea* (Costa, Silva and Ogliari, 2016; Silva, Vidal, Costa, Vaio and Ogliari, 2015). However, information is still scarce regarding its genetic potential as a gene source for popcorn breeding programs, neglecting this valuable source of diversity with adaptive potential (Dwivedi, Ceccarelli, Blair, Upadhyaya, Are and Ortiz, 2015).

This study aimed to evaluate the genetic potential of local popcorn varieties (LPV) from the municipalities of Anchieta (ANC) and Guaraciaba (GBA), in far western Santa Catarina, Southern Brazil, and set which traits have a positive influence on the grains yield and popping expansion.

Materials and methods

Study area

The experiments were carried out in two distinct regions of Santa Catarina, evaluating 13 LPV from GBA, one from ANC, plus one open-pollinated

check (RS 20), developed by the State Federation for Agriculture and Livestock Research (Federação Estadual de Pesquisa Agropecuária, FEPAGRO/RS). All treatments had a predominantly white pericarp, except for the check, whose pericarp was yellow (Table 1). The LPV with white pericarp color were chosen due to its major presence in the region according to Costa et al (2016).

Table 1. Identification, origin, cultivation time and shape of local popcorn varieties with predominantly white grains evaluated in experiments conducted in Florianópolis and Anchieta, Santa Catarina - Brazil, 2014/2015 crop year.

IDV ¹	Community/City ²	Shape
574A	Liso Baixo/ GBA	Pointed
648C	Olímpio/ GBA	Round
283A	Guataparalto/ GBA	Round
319E	Guataparema/ GBA	Pointed
66A	Barra da Traíra/ GBA	Pointed
2360A	Cordilheira/ ANC	Pointed
884B	São João/ GBA	Pointed
977A	São Vicente/ GBA	Round
244A	Flores da Cunha/ GBA	Pointed
793B	Perondi/ GBA	Round
857C	São Cristovão/ GBA	Round
612A	Mirim/ GBA	Round
48A	Barra da Guaraciaba/ GBA	Round
880A	São Domingos/ GBA	Pointed
RS 20	Rio Grande do Sul	Round

¹Identification code of local varieties from the Federal University of Santa Catarina's genebank; ²Anchieta (ANC) and Guaraciaba (GBA); NA - No answer. Source: date obtained from Census of Diversity's database

The first experiment was carried out from Sep 2014 to Feb 2015 in Florianópolis (FLN), located on the east coast (27.41° S lat, 48.32° W long, 2.0 m asl) of the state of Santa Catarina. The second experiment was conducted from Dec 2014 to May 2015 in ANC (26.59° S lat, 53.38° W long, 700 m asl), far west part of the state, 745 km from FLN.

Experimental design and evaluated traits

A completely randomized block design with three replications was adopted. The plot consisted of two 5.0-m-long rows spaced 0.8 m apart; the usable plot area was 2.4 m² and plant density was 62,500 plants ha⁻¹ after thinning.

Fertilizers were applied in the FLN experiment according to the results of soil analysis (Table 2) and as recommend for the state of Santa Catarina (50 kg ha⁻¹ N, 35 kg ha⁻¹ P₂O₅, and 25 kg ha⁻¹ K₂O). In ANC, the experimental area was not fertilized (Table 2), since this is the common practice among the popcorn maintainers in the region.

Table 2. Soil analysis of the experimental areas at Anchieta and Florianópolis, Santa Catarina, Aug 2014.

Analysis	ANC	FLN
Clay content (%)	20.0	10.0
pH-Water 1:1	6.3	5.4
Phosphor (mg dm ⁻³)	19.7	40.6
Potassium (mg dm ⁻³)	176.0	70.0
Organic matter (%)	2.1	4.2
Calcium (cmolc dm ⁻³)	18.4	2.3
Magnesium (cmolc dm ⁻³)	3.6	1.0
CEC pH 7.0 (cmolc dm ⁻³)	24.7	8.3

Report emitted by EPAGRI's laboratory, part of the Official Network of Soil Analysis Labs of Santa Catarina and Rio Grande do Sul - ROLAS. Report digital signature: FLN (6B2176E1-FCB1-410E-99CE-B6B4A1BCDBE7) and ANC (C17CCE5-2476-4FAA-8AA1-37768838373E) available on: <http://solosch.epagri.sc.gov.br/>.

In both locations, the evaluated traits were GY, PE, and popping expansion disregarding the weight of the unpopped kernels (PEW). Popping expansion was estimated as the ratio between the final volume of popcorn popped in a microwave oven (1 min 30 s) and the initial grain weight (30 g), based on Normative Instruction no. 61 from the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA) (Brazil, 2011). For PEW, the weight of the unpopped kernels was subtracted from the PE, and so the maximum expansion potential was estimated. Additionally, another 11 traits were evaluated, all commonly correlated with GY, PE, and PEW, namely: plant height (PH), height of first ear/plant height ratio (HEP), PRL, EL, NGR, NRE, ED, weight of 100 grains (WHG), volume of 100 grains (VHG), thickness/width ratio (TWR = T/W), with *T* corresponding to grain thickness and *W* to grain width), and caryopsis circularity index (CCI) ($CCI = T / (W+L)$), with *T* corresponding to grain thickness, *W* to grain width, and *L* to grain length).

Data analysis

Analysis of variance was performed for each environment and followed the fixed model, except for block and experimental error, considering the following equation: $Y_{ij} = \mu + t_i + b_j + e_{ij}$, where: Y_{ij} is the observation of *i* th and *j* th block; μ is the overall mean of the experiment; t_i is the additive effect of treatments; b_j is the additive effect of random blocks; and e_{ij} is the random experimental error. A Scott-Knott grouping test was performed at the 5% probability error, for each variable and experiment, in the analyses whose F test was significant ($P < 0.05$).

Analysis of variance was also performed for the two environments and followed the joint analysis (CA) fixed model, except for block and

experimental error, as follows: $Y_{ijk} = \mu + t_i + l_j + tl_{ij} + b_{k(j)} + e_{ijk}$, where Y_{ijk} is the observation of *i* th treatment ($i = 1, 2, \dots, 15$), *j* th environment ($j = 1, 2$), and *k* th block ($k = 1, 2, 3$); μ is the overall mean of the experiment; t_i is the effect of *i* th treatment (popcorn varieties); l_j is the effect of *j* th environment; tl_{ij} is the effect of the interaction between location and treatment; $b_{k(j)}$ is the effect of random blocks within environment and; e_{ijk} is the experimental error.

For the analyses of variance per location, the coefficient of experimental variation (EVC) was estimated for each environment as $EVC\% = 100 * \sqrt{RMS} / \mu$, where μ is the overall mean of the analyzed variable and *RMS* is the residual mean square. The genetic quadratic component was estimated as $\sigma_g = ((MST-RMS)) / J$, where *MST* is the mean square of treatments and *J* is the number of replications. The coefficient of genetic variation (GVC) was calculated as $GVC\% = 100 * \sqrt{\sigma_g} / \mu$.

In order to understand how each trait influences the yield and popping expansion, the Pearson's linear correlations based on phenotypic variances of CA was performed among GY, PE, PEW, and the other 11 traits.

Using the PE, PEW, and GY means, it was used the index selection based on classical rank summation without economic weight (Mulamba and Mock, 1978), and a pressure selection of 20% to select promising varieties for the recurrent selection or formation of intervarietal hybrids. Analysis was performed using the software GENES (Cruz, 2006).

Results

Varieties RS 20 (check) and 612A had similar means for HEP in both environments and for PH in FLN. Both varieties showed significantly lower means for HEP and PH than the other varieties in both experiments. For both variables, the treatment means showed to be consistent between the two environments and were $\approx 47\%$ (PH) and $\approx 35\%$ (HEP) greater than the means of check variety based on the combined analysis with both environments (Table 3).

Higher means for WHG and VHG were estimated for 857C, 793B, 884B, and 2360A in FLN and, in both experiments, the means of these varieties were significantly higher than the means of check for both variables. The treatment means were also significantly higher in FLN for WHG and VHG and were $\approx 35\%$ (WHG) and 32% (VHG) greater than check means in this environment (FLN) and $\approx 14\%$ (WHG) and $\approx 5\%$ (VHG) higher than check means in ANC (Table 3). Ear measurements, expressed by ED and EL, showed

Table 3. Analysis of variance and Skott-Knott test for plant height (PH), first ear height / plant height relation (HEP), weight of 100 grains (WHG), volume of 100 grains (VHG) and ear diameter (ED) from the evaluation of local and commercial varieties of popcorn, in experiments conducted in Florianópolis (FLN) and Anchieta (ANC), Santa Catarina – Brazil, 2014/2015 crop year.

Treatment	PH (m)		HEP		WHG (g)		VHG (mL)		ED (mm)	
	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC
574A	1.48c	1.43a	0.57b	0.56a	16.0b	14.9a	19.8c	14.8b	30.8b	27.5
648C	1.43c	1.64a	0.5c	0.58a	11.8c	11.4b	14.7c	14.8b	27.9b	26.6
283A	1.59b	1.55a	0.52b	0.58a	13.5c	9.7b	16.2c	12.3b	31.8a	26.9
319E	1.42c	1.58a	0.54b	0.55a	13.2c	11.5b	16.2c	15.3b	32.1a	27.4
66A	1.41c	1.58a	0.57b	0.57a	13.8c	10.2b	17.8c	14.3b	29.7b	27.8
2360A	1.57b	1.67a	0.57b	0.57a	18.3a	12.1b	23.0b	17.3a	32.5a	30.0
884B	1.89a	1.83a	0.64a	0.61a	21.5a	12.8a	28.3a	17.2a	33.4a	27.9
RS20	1.12d	0.99c	0.39d	0.43b	11.7c	10.8b	15.0c	15.3b	29.9b	25.6
244A	1.55b	1.53a	0.55b	0.58a	15.6b	12.8a	18.5c	17.5a	28.9b	28.5
793B	1.68b	1.63a	0.59b	0.61a	21.6a	13.0a	27.7a	18.0a	33.7a	30.6
857C	1.83a	1.84a	0.61a	0.62a	21.6a	14.7a	27.2a	18.5a	33.8a	28.3
612A	1.26d	1.33b	0.42d	0.48b	11.9c	11.8b	15.0c	15.3b	29.8b	27.1
48A	1.59b	1.57a	0.55b	0.54a	14.4b	11.9b	17.7c	16.0b	32.4a	28.2
880A	1.76 ^a	1.63a	0.66a	0.59a	15.6b	14.5a	19.0c	18.8a	30.7b	29.8
977A	1.58b	1.63a	0.55b	0.59a	16.2b	11.9b	20.7c	16.3a	29.7b	27.7
Mean ¹	1.544	1.562	0.548	0.564	15.8	12.3	19.8	16.1	31.1	28.0
GvC (%) ²	12.49	11.83	12.42	7.12	20.69	10.31	22.17	8.92	4.80	2.56
Evc(%) ³	7.05	9.72	7.69	8.63	12.43	12.84	13.26	10.91	5.86	6.96
Genotype ⁴	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.008	0.000	0.007	0.005	0.221
GxEI ⁵		0.506		0.273		0.000		0.000		0.307
Location ⁶		0.725		0.222		0.001		0.000		0.004

¹Mean of three replications in each site; ²Genotypic variation coefficient; ³Experimental variation coefficient; ⁴Significance of the difference between treatments extracted from the variance analysis; ⁵Significance of the genotype x environment interaction extracted from the variance analysis of the joint analysis; ⁶Significance of the difference between sites; ^aNot significant at 5% error probability in F test. *Means followed by the same letters are not statistically different in Skott-Knott test at 5% error probability.

significant differences between treatments only in FLN, and treatment means were significantly higher in FLN. When considering the treatment means estimated in FLN for variables ED and EL (Table 3 and Table 4), the values were $\approx 4\%$ higher (ED) and $\approx 6\%$ lower (EL) than check means. Seven local varieties (283A, 319E, 2360A, 884B, 793B, 857C, and 48A) showed ED means higher than check in FLN, while in ANC, the six outstanding varieties (283A, 2360A, 884B, RS20, 793B, and 880A) included check.

Treatments means for PRL in ANC were not significantly different than those estimated in FLN. The more prolific varieties (574A, 648C, 283A, 319E, 66A, and 2360A) evaluated in FLN differed significantly from the check. In ANC,

despite the significant F test, the Scott-Knott grouping test did not detect differences between treatments because of the high Evc% and low GvC% (Table 4).

Significant differences among varieties were detected for variables *NRE* and *NGR* only in FLN. In that location, there was a larger mean range for *NRE* and a higher GvC% for *NGR* compared with *ANC* (Table 4).

Estimates for *TWR* and *CCI* showed differences between treatments by the Scott-Knott test only in FLN (both with $P \leq 0,01$), although the F value was significant for *CCI* in *ANC* ($P \leq 0,05$) (Table 5). In FLN, treatments were separated by the Scott-Knott test into two groups, both for *TWR* and *CCI*. Furthermore, *ANC* showed higher

Table 4. Analysis of variance and Skott-Knott test for ear length (EL), prolificacy (PRL) number of rows per ear (NRE) and number of grains per row (NGR) from the evaluation of local and commercial varieties of popcorn, in experiments conducted in Florianópolis (FLN) and Anchieta (ANC), Santa Catarina – Brazil, 2014/2015 crop year.

Treatment	EL (cm)		PRL		NRE		NGR	
	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC
574A	12.67b	10.73	1.00a	0.58a	13.7a	13.6	25.9b	20.5
648C	11.59b	11.81	1.01a	0.84a	12.8b	12.7	27.9a	23.7
283A	14.08a	11.67	1.03a	0.82a	15.3a	14.0	35.7a	24.0
319E	12.78b	11.45	0.86a	0.60a	15.6a	13.3	30.7a	23.3
66A	12.61b	13.15	0.81a	0.72a	12.7b	13.8	25.1b	25.4
2360A	14.24a	11.12	0.88a	0.69a	13.2b	13.6	26.3b	20.1
884B	14.69a	10.81	0.70b	0.54a	13.4b	12.6	20.3b	21.6
RS20	14.02a	10.77	0.40b	0.65a	13.7a	13.6	30.8a	19.9
244A	11.31b	11.75	0.60b	0.68a	11.4b	12.8	21.3b	23.9
793B	13.90a	11.44	0.67b	0.47a	12.5b	13.8	28.7a	23.5
857C	11.71b	11.38	0.66b	0.51a	12.3b	13.7	21.2b	19.9
612A	12.21b	9.93	0.59b	0.75a	13.9a	13.8	25.7b	17.0
48A	12.92b	11.69	0.75b	0.70a	14.4a	14.0	30.0a	23.9
880A	15.99a	13.65	0.96a	0.95a	14.0a	14.1	29.1a	25.7
977A	12.55b	11.21	0.77b	0.52a	12.6b	12.7	20.7b	20.5
Mean ¹	13.15	11.5	0.78	0.67	13.4	13.5	26.6	22.2
Gvc (%) ²	7.58	-	19.08	15.59	7.1	-	14.06	2.83
EVc(%) ³	10.64	15.85	20.83	22.07	7.84	8.33	14.37	17.63
Genotype ⁴	0.019	0.7906 ^{ns}	0.0025	0.020	0.0023	0.7961 ^{ns}	0.0012	0.4189 ^{ns}
GxEI ⁵	0.4688		0.0619		0.2383		0.0767	
Location ⁶	0.0227		0.1371		0.7957		0.041	

¹Mean of three replications in each site; ²Genotypic variation coefficient; ³Experimental variation coefficient; ⁴Significance of the difference between treatments extracted from the variance analysis; ⁵Significance of the genotype x environment interaction extracted from the variance analysis of the joint analysis; ⁶Significance of the difference between sites; ^{ns}Not significant at 5% error probability in F test. Means followed by the same letters are not statistically different in Skott-Knott test at 5% error probability.

rates, on average, for both variables; i.e., rounder grains, possibly because of the larger available space for grains that grow in thickness, in less productive ears.

Local popcorn variety 574A exhibited a higher mean PE in both experiments, and the mean value estimated for the two environments was 21% higher than the minimum value of 30 mL g⁻¹ established by MAPA for marketing (Brazil, 2011) and 43% higher than the check mean estimated in both FLN and ANC. Local popcorn variety 880A also stood out for this same variable for showing higher means than check in both locations.

For PEW evaluated in ANC, LPV 574A also obtained a significantly higher mean and was 47% higher than that established by MAPA. In

FLN, the same LPV (574A) did not differ from check (RS 20) or LPV 977A. The means for PEW were around 25% larger than those estimated for PE. Check means were higher than the treatment means in both experiments.

The GY means showed a significant variation between the experiments. In ANC, the treatments mean corresponded to ≈41% of that obtained in FLN. Varieties 880A, 48A, 283A, 319E, and 2360A showed the highest means in FLN, where the experimental area was fertilized. Local varieties 880A, 48A, 283A, and 319E displayed the highest means in both environments. The Gvc% varied across experiments and variables. The average Gvc% in FLN of all variables was 13%, and in ANC it was 10%. The largest

Table 5. Analysis of variance and Skott-Knott test for grain thickness / width relation (TWR), caryopsis circularity index (CCI), popping expansion (PE), popping expansion without the weight of unpopped grains (PEW) and grain yield (GY) from the evaluation of local and commercial varieties of popcorn, in experiments conducted in Florianópolis (FLN) and Anchieta (ANC), Santa Catarina – Brazil, 2014/2015 crop year.

Treatment	TWR		CCI		PE (mL g ⁻¹)		PEW (mL g ⁻¹)		GY (t ha ⁻¹)	
	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC	FLN	ANC
574A	0.73a	0.79	0.28a	0.31a	34.1a	38.6a	40.0a	44.2a	2.176b	0.657b
648C	0.60b	0.67	0.25b	0.29a	27.0c	24.9c	35.8b	28.3c	1.704b	0.97a
283A	0.60b	0.70	0.24b	0.29a	19.3e	22.9d	23.4e	27.5c	2.824a	0.987a
319E	0.70a	0.73	0.28a	0.30a	21.1e	20.9d	29.9d	29.1c	2.417a	0.921a
66A	0.66b	0.72	0.26b	0.29a	24.4d	24.2c	30.0d	29.6c	1.652b	1.259a
2360A	0.66b	0.67	0.28a	0.29a	26.9c	23.6d	33.3c	29.6c	2.386a	0.783b
884B	0.82a	0.74	0.32a	0.3a	29.6b	27.4c	36.0b	32.6b	1.813b	0.720b
RS20	0.70a	0.77	0.31a	0.35a	26.9c	23.3d	38.6a	34.0b	-	0.760b
244A	0.74a	0.71	0.29a	0.30a	23.2d	21.8d	28.2d	25.7d	1.394b	0.913a
793B	0.61b	0.69	0.25b	0.29a	23.9d	18.8d	29.3d	24.4d	2.01b	0.639b
857C	0.75a	0.76	0.29a	0.31a	29.8b	26.9c	32.5c	35.3b	1.737b	0.671b
612A	0.66b	0.76	0.29a	0.33a	26.0c	26.1c	33.8c	35.2b	1.743b	0.532b
48A	0.60b	0.65	0.25b	0.27a	21.9e	25.0c	25.2e	28.8c	2.925a	1.122a
880A	0.75a	0.77	0.29a	0.31a	31.1b	30.3b	36.7b	36.5b	2.901a	1.215a
977A	0.77a	0.79	0.30a	0.32a	29.4b	27.1c	39.3a	37.1b	1.588b	0.655b
Mean ¹	0.69	0.73	0.28	0.3	26.3	25.5	32.8	31.9	2.091	0.854
GVC (%) ²	8.95	3.7	7.71	4.28	15.11	17.25	15.17	16.04	19.15	18.57
EVc(%) ³	8.38	8.12	6.98	6.76	5.88	9.99	4.79	5.98	22.74	27.37
Genotype ⁴	0.001	0.138 ^{ns}	0.000	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.028
GxEI ⁵	0.508 ^{ns}		0.349 ^{ns}		0.005		0.000		0.039	
Location ⁶	0.006		0.000		0.058		0.020		0.000	

¹Mean of three replications in each site; ²Genotypic variation coefficient; ³Experimental variation coefficient; ⁴Significance of the difference between treatments extracted from the variance analysis; ⁵Significance of the genotype x environment interaction extracted from the variance analysis of the joint analysis; ⁶Significance of the difference between sites; ^{ns}Not significant at 5% error probability in F test. Means followed by the same letters are not statistically different in Skott-Knott test at 5% error probability.

differences among environments were found for the traits WHG, VHG, NGR, and TWR. In both environments, PRL and GY had the highest GVC%. In ANC, variables EL and NRE had higher RMS than they did MST, making it impossible to estimate the GVC%.

Significant genotype × environment (G×E) interactions were detected for WHG, VHG, PE, PEW, and GY. For these variables, some varieties were less influenced by environment change. Variety 612A, for example, maintained a stable mean in FLN and ANC for variables WHG, VHG, and PE; 880A was constant between

environments for variables VHG and PEW; and 66A was more stable for PE, besides showing the lowest reduction in GY (24%) from FLN to ANC. Popcorn varieties 244A, 283A, and 48A had an increase in PEW in ANC, contrary to the general downward trend observed in that environment for the other varieties.

The highest estimated correlations with GY were obtained with PRL, NGR (positive), and CCI (negative) (Table 6). Popping expansion showed the highest correlations with TWR, PEW (positive), and NGR (negative), while PEW displayed the highest correlations with TWR, CCI, PE (positive),

and NGR (negative) (Table 6). Correlations with PEW were higher than the correlations with PE, for the same variables.

The results of the present study highlight, for this purpose, local popcorn varieties 574A, 880A, and 884B, based on Mulamba and Mock's index.

Discussion

Results for the correlations between GY and traits PRL, NGR, and CCI followed the same trend as those reported in other studies; e.g., Vidal-Martínez, Clegg, Johnson and Valdivia-Bernal (2001), who correlated GY with NGR (0.90), and Broccoli and Burak (2004), who correlated GY with PRL (0.32) and CCI (-0.32).

In the correlations established with PE, Broccoli and Burak (2004) obtained a positive value (0.47) with CCI, and Lyerly (1942) with TWR (0.57), which are very close to the values observed in the present study. In the evaluation of the PEW we intended to assess PE only with poppable grains and thus determine the correlation with the maximum expansion potential of each variable. In the present study, PEW showed a high positive correlation with CCI and TWR and a moderate negative correlation with NGR and GY (Table 6).

Table 6. Correlation between popping expansion (PE), popping expansion without the weight of unpopped grains (PEW) and grain yield (GY), between themselves and with another 11 variables analyzed in experiments conducted with local popcorn varieties, in Anchieta (ANC) and Florianópolis (FLN), Santa Catarina - Brazil, 2014/2015 crop year.

Variável	PE	PEW	GY
TWR	0.569*	0.702**	-0.392
CCI	0.407	0.707**	-0.679**
HEP	0.137	-0.179	0.500
PH	0.005	-0.291	0.431
PRL	0.100	-0.069	0.726**
WHG	0.343	0.080	-0.002
VHG	0.166	-0.011	-0.076
EL	-0.035	-0.076	0.627**
NRE	-0.198	-0.167	0.569*
NGR	-0.449	-0.493	0.711*
ED	-0.124	-0.377	0.420
PE	—	0.847**	-0.193
PEW	0.857**	—	-0.434
GY	-0.193	-0.434	—

¹Pearson's linear correlation; ²Significance of Pearson's linear correlation; TWR - grain thickness/width relation; CCI - caryopsis circularity index; HEP - first ear height/plant height relation, PH - plant height; PRL - prolificacy; WHG - weight of 100 grains; VHG - volume of 100 grains; EL - ear length; NRE - number of rows per ear; NGR - number of grains per row of ear; ED - ear diameter.

Based on the correlations established between PE and PEW with CCI and TWR, both variables (CCI and TWR) can be considered good indirect measurements for the identification of varieties with good PE, especially TWR, which showed the strongest positive correlation with PE and PEW, and a weak negative correlation with GY. Selection based on high TWR values, as an indirect way of identifying varieties with higher PE without loss of GY, can be related to the pointed grain shape of some LPV. They are generally longer due to their morphology, and consequently contain a larger mass (Table 5 and Table 6).

The treatments mean for PH were lower than those observed by Solalinde, Scapim, Vieira, Amaral Júnior, Vivas, Pinto Mora and Viana (2014) and Miranda, Souza, Galvão, Guimarães, Melo and Santos (2008). Although these second authors also observed the lowest values for PH and HEP in variety RS 20, in the set of evaluated genotypes. Reduced PH and HEP are important traits in the popcorn crop, since varieties with low PH and HEP are less susceptible to lodging and stalk breaking (Kist, Ogliari, Miranda Filho and Alves, 2010).

For variables WHG and VHG, only the means in FLN were higher than those obtained by Pereira and Amaral (2001), whose estimated values were 12.6 g and 17.9 mL, respectively. Mean values in the present work for EL were lower than those estimated by Agele, Ayanwole and Olakojo (2008), without any of the varieties showing values close to the mean of 17.6 cm, obtained by the said authors.

Variable PRL also showed a much lower mean than those observed by Ematné, Nunes, Dias, Prado and Souza (2016) (1.33) and by Miranda, Coimbra, Godoy, Souza, Guimarães and Melo (2003) (1.2). Although PRL means are low, there is high genetic variation for the selection of superior varieties, as expressed by GVC% estimates. Prolificacy values lower than 1 express inability of some plants to produce fertile ears. This behavior may be due to inbreeding or even to the inexistence of artificial selection, directly affecting grain yield.

Overall, the average PE across the varieties was close to the 25 g mL⁻¹ found by Freitas Júnior, Amaral Júnior, Rangel and Viana (2009) in full-sibling progenies and much higher than the average 16.5 mL g⁻¹ estimated by Miranda, Souza, Galvão, Guimarães, Melo and Santos (2008) and 18.7 mL g⁻¹ by Miranda, Coimbra, Godoy, Souza, Guimarães and Melo (2003).

Regarding the estimated means for PE and PEW, the values might have been underestimated in relation to other studies. The 23% difference between PE and PEW is indicative that the

maximum grain popping expansion could not have been reached, either because of the occurrence of damaged grains, which cause a significant reduction in PE values, or because of insufficient grain exposure time in the microwave oven. Although the present study considered the exposure time of one and a half minutes, established by MAPA, in many cases, this time was less than that used by others researchers (Jele, Derera and Siwela, 2014; Scapim, Pacheco, Amaral Júnior, Vieira, Pinto and Conrado, 2010; Silva, Amaral Júnior, Gonçalves, Candido, Vittorazzi and Scapim, 2013), possibly because it underestimates real values.

As for GY, even in FLN, where the means were higher than in ANC, estimates were considerably lower than those obtained by Miranda, Souza, Galvão, Guimarães, Melo and Santos (2008) (2980 kg ha⁻¹) and Miranda, Souza, Guimarães, Namorato, Oliveira and Soares (2009) (2740 kg ha⁻¹). Although the EVc% estimated for GY was very high, these values are common in grain yield evaluations (Daros, Amaral Júnior and Pereira, 2002; Freitas, Amaral Júnior, Freitas Júnior, Cabral, Ribeiro and Gonçalves, 2014; Freitas Júnior, Amaral Júnior, Rangel and Viana, 2009; Silva, Amaral Júnior, Gonçalves, Candido, Vittorazzi and Scapim, 2013), because this is a trait that reflects the results of many other correlated variables.

Taking into consideration only traits common to those evaluated by Miranda, Coimbra, Godoy, Souza, Guimarães and Melo (2003) (PH, HEP, WHG, PRL, and GY), with the average Gvc% close to 14%, and common traits evaluated by Freitas, Amaral Júnior, Freitas Júnior, Cabral, Ribeiro and Gonçalves (2014) (PH, DCO, PRL, GY and PE), with average Gvc% close to 7%, FLN was superior, on average, to both studies (17%), while ANC (13%) showed an average Gvc% only lower than that found by Miranda, Coimbra, Godoy, Souza, Guimarães and Melo (2003). In this case, environmental conditions in FLN exposed more markedly the variations of genetic origin in the set of evaluated varieties.

The G×E interaction observed by Broccoli and Burak (2004) and Scapim et al. (2010) for variables GY and PE reinforce the results of the present study. Among the traits that did not show significant G×E in this study, only HEP expressed a different performance in other experiments (Freitas, Amaral Júnior, Freitas Júnior, Cabral, Ribeiro and Gonçalves, 2014), while PH, ED, EL, CCI, NRE, and NGR agree with the works of Broccoli and Burak (2004), Freitas, Amaral Júnior, Freitas Júnior, Cabral, Ribeiro and Gonçalves (2014), and Vidal-Martínez, Clegg, Johnson and Valdivia-Bernal (2001).

Local varieties 612A, 880A, and 66A showed lower variation between environments for traits associated with PE, and LPV 66A and 244A presented lower variation between locations regarding GY. Varieties 283A and 48A showed higher PE means when cultivated in their region of origin, even when no fertilizer was applied.

Based on the genetic potential of these LPV, performance between environments, and the favorable correlations established between traits, it is possible to outline genetic improvement strategies that value the complementary combination between populations for attributes of high performance, as is done in the development of intervarietal hybrids and interpopulational improvement.

Conclusions

Among the varieties, the thickness/width ratio shows the highest correlation with popping expansion.

Local varieties 574A and 880A shows average popping expansion superior to 30 mL.g⁻¹ being fit for commercial use even without formal improvement.

Local varieties 574A, 880A, and 884B presented potential for breeding strategies focused on the development of composite populations, given the possibility of complementary combination among populations for high-performance attributes.

References

- Agele, S. O., Ayanwale, J. A., and Olakojo, S. A. (2008). Evaluation of some newly developed popcorn varieties for tolerance to diseases and pests and popping quality in Southwestern Nigerian ecologies. *Advances in Environmental Biology*, 2(3), 89-95. http://scinet.dost.gov.ph/union/Downloads/89-95_182087.pdf.
- Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction n° 61 = Instrução Normativa n° 61, 22 Dec 2011. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapaandchave=263800632>.
- Broccoli, A. M., and Burak, R. (2004). Effect of genotype x environment interactions in popcorn maize yield and grain quality. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2, 85-91. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2004021-64>.
- Coimbra, R. R., Miranda, G. V., Marcelo, J., Viana, S., and Damião, C. (2002). Estimation of genetic parameters and prediction of gains for DFT1-Ribeirão popcorn population. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1, 33-38. <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8128f42-49c2-7d87.pdf>.

- Costa, F. M., Silva, N. C. A., and Ogliari, J. B. (2016) Maize diversity in Southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-20. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-016-0391-2>.
- Cruz C. D. (2006) *Programa GENES: Biometria*. Viçosa, UFV, 382p.
- Cruz, J. C., Filho, I. A. P., and Queiroz, L. R. Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14. In: EMBRAPA MILHO E SORGO, Available at: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>>. Accessed at:10 Oct. 2014.
- Daros, M., Amaral Júnior, A.T., and Pereira, M. G. (2002). Genetic gain for grain yield and popping expansion in full-sib recurrent selection in popcorn. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2(3), 339-344. <http://dx.doi.org/10.12702/1984-7033.v02n03a03>.
- Dwivedi, S. L., Ceccarelli, S., Blair, M. W., Upadhyaya, H. D., Are, A. K., and Ortiz, R. (2015). Landrace germplasm for improving yield and abiotic stress adaptation. *Trends in plant science*, 21(1), 31-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.012>.
- Ematé, H. J., Nunes, J. A. R., Dias, K. O. G., Prado, P. E. R., and Souza, J. C. (2016). Estimate of genetic gain in popcorn after cycles of phenotypic recurrent selection. *Genetic and Molecular Research*, 15(2), 1-5. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15026860>.
- Freitas Júnior, S. P., Amaral Júnior, A. T., Rangel, R. M., and Viana, A. P. (2009). Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.12702/1984-7033.v09n01a01>.
- Freitas, I. L. J., Amaral Júnior, A. T., Freitas Júnior, S. P., Cabral, P. D. S., Ribeiro, R. M. and Gonçalves, L. S. A. (2014). Genetic gains in the UENF-14 popcorn population with recurrent selection. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 518-527. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.January.21.21>.
- Jele, P., Derera, J., and Siwela, M. (2014). Assessment of popping ability of new tropical popcorn hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, 8(6), 831-839. <http://search.informit.com.au/entSummary;dn=477516971039757;res=IELHSS>.
- Kist, V., Ogliari, J. B., Miranda Filho, J. B., and Alves, A. C. (2010). Genetic potential of a maize population from Southern Brazil for the modified convergent-divergent selection scheme. *Euphytica*, 176(1), 25-36. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-010-0207-y>.
- Lyerly, P. J. (1942). Some genetic and morphological characters affecting the popping expansion of popcorn. *Journal of the American Society of Agronomy*, 34(2), 986-995. <http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=15091andcontext=rtd>.
- Miranda, G. V., Coimbra, R. R., Godoy, C. L.; Souza, L. V., Guimarães, L. J. M., and Melo, A. V. (2003). Potencial de melhoramento e divergência genética em cultivares de milho-pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(6), 681-688. <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/6624>.
- Miranda, G. V., Souza, L. V., Galvão, J. C. C., Guimarães, L. J. M., Melo, A. V., and Santos, I. C. (2008). Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations. *Euphytica*, 162(3), 431-440. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-007-9598-9>.
- Miranda, G. V., Souza, L. V. D., Guimarães, L. J. M., Namorato, H., Oliveira, L. R., and Soares, M. O. (2009). Multivariate analyses of genotype x environment interaction of popcorn. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(1), 45-50. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009000100007>.
- Mulamba, N.N., and Mock, J.J. (1978). Improvement of yield potential of the ETO Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 7, 40-51.
- Pereira, M. G., and Amaral Júnior, A. D. (2001). Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1(1), 3-10. <http://dx.doi.org/10.13082/1984-7033.v01n01a01>.
- Scapim, C. A., Pacheco, C. A. P., Amaral Júnior, A. T., Vieira, R. A.; Pinto, R. J. B., and Conrado, T. V. (2010). Correlations between the stability and adaptability statistics of popcorn cultivars. *Euphytica*, 174(2), 209-218. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-010-0118-y>.
- Silva, T. R. C., Amaral Júnior, A. T., Gonçalves, L. S. A., Candido, L. S., Vittorazzi, C., and Scapim, C. (2013). Agronomic performance of popcorn genotypes in Northern and Northwestern Rio de Janeiro State. *Acta Scientiarum*, 35(1), 57-63. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i1.15694>.
- Silva, N. C. A., Vidal, R., Costa, F. M., Vaio, M., and Ogliari, J. B. (2015). Presence of *Zea luxurians* (Durieu and Ascherson) Bird in Southern Brazil: Implications for the Conservation of Wild Relatives of Maize. *PloS One*, 10(10), e0139034. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139034>.
- Singh, V., Barreiro, N. L., Mckinstry, J., Buriak, P., and Eckhoff, S. R. (1997). Effect of kernel size, location, and type of damage on popping characteristics of popcorn. *Cereal chemistry*, 74(5), 672-675. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.5.672>.
- Solalinde, J. M. Q., Scapim, C. A., Vieira, R. A., Amaral Júnior, A. T., Vivas, M., Pinto, R. J. B., Mora, F., Viana, A. P. (2014). Performance of popcorn maize population in South American Avatí Pichingá using diallel analysis. *Australian Journal of Crop Science*, 8(12), 1632-1638.
- Vidal-Martínez V. A., Clegg, M., Johnson, B., and Valdivia-Bernal, R. Phenotypic and genotypic relationships between pollen and grain yield in maize. *Agrociencia*, 35(5), 503-511. <http://www.redalyc.org/html/302/30235504/>.

Chemical profile of the volatiles of *Baccharis salicifolia* (Asteraceae) and interaction with *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae)

Perfil químico de volátiles de *Baccharis salicifolia* (Asteraceae) e interacción con *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae)

Ericka Nieves-Silva^{1*} and Angel A. Romero-López²

1. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Centro de Agroecología, Laboratorio de Manejo de Plagas y Enfermedades, Edificio VAL1, Km 1.7 carretera a San Baltazar Tetela, San Pedro Zacachimalpa, C.P. 72960, Puebla, Puebla, México.

2. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Infoquímicos, Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio Edificio 112-A, Ciudad universitaria, Col. Jardines de San Manuel, C.P. 72570. Puebla, Puebla, México. *Corresponding autor: enievess@outlook.com

Rec.:2018-03-16 Acept.: 2019-08-10

Abstract

Plant products or substances mediate interactions among organisms from different trophic levels, including phytophagous insects. These interactions have been cited in a chemical-ecology context for species of Coleoptera Melolonthidae. However, there are no previous reports of these interactions among melolonthid beetles species distributed in Mexico and host plants. For the above, the interaction between adults of ‘rose chafer’ *Macrodactylus nigripes* Bates (Coleoptera: Melolonthidae) and ‘seep willow’ shrub *Baccharis salicifolia* (Ruíz and Pav.) Pers. (Asteraceae) was recorded and the leaves volatiles of seep willow that might be involved in the attraction of these insects were extracted and identified. The sequence of behavior patterns that conforms this interaction was described. Females of *M. nigripes* emerge from the soil and flight to the leaves of seep willow shrubs. Each female settled on leaf and they place their mandibles on the leaf margin and start moving them from right to left to obtain small leaf fragments to ingest. In addition, females exhibit a similar ‘calling’ behavior as well as the others species. Following the females, males emerge from the soil and repeat the females’ behavior, approaching them for mating. A list of the leaves volatiles of seep willow was generated by solid phase microextraction (SPME) and coupled gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), where the most abundant chemicals were α -pinene, trimethylindan and cyclohexylbenzene. These compounds have been previously reported in other plant species, including some species considered as host plants for Melolonthidae.

Key words: Attraction, plant volatiles, “rose chafer”, SPME, GC-MS.

Resumen

Los productos o substancias volátiles de plantas median las interacciones entre los organismos de diferentes niveles tróficos, incluidos los insectos fitófagos. Estas interacciones se han citado en un contexto químico-ecológico para especies de Coleoptera Melolonthidae. Sin embargo, no hay informes previos sobre estas interacciones entre las especies de Melolonthidae distribuidas en México y sus plantas hospederas. Por ello, se registró la interacción entre adultos de *Macrodactylus nigripes* Bates (Coleoptera: Melolonthidae) y el arbusto de azumiate (*Baccharis salicifolia* Ruíz and Pav.) Pers. (Asteraceae) y se extrajeron e identificaron los compuestos volátiles de las hojas que podrían estar involucrados en la atracción de estos insectos. Se describió la secuencia de patrones de comportamiento que conforman esta interacción. Se observó que las hembras de *M. nigripes* emergen del suelo y se desplazan en vuelo hacia las hojas de los arbustos de azumiate. Cada hembra se posiciona en la hoja y colocan sus mandíbulas en el margen de éstas y comienzan a moverlas de derecha a izquierda para obtener pequeños fragmentos de hojas e ingerirlos. Asimismo, las hembras muestran un patrón de comportamiento de ‘llamado sexual’. Enseguida, los machos emergen del suelo y repiten el comportamiento de las hembras, acercándose a ellas para la cópula. Se generó un listado de los compuestos volátiles de las hojas de azumiate mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM), donde los compuestos más abundantes fueron α -pineno, trimetilindan y ciclohexilbenceno. Estos compuestos se han reportado anteriormente en otras especies de plantas, incluidas algunas especies consideradas como plantas hospederas para integrantes de Melolonthidae.

Palabras clave: Atracción, volátiles de plantas, “escarabajo de las rosas”, SPME, GC-MS.

Introduction

Plant volatiles are infochemicals based on complex mixtures of a wide variety of organic compounds. These volatiles have important ecological functions for plants such as pollinators' attraction, seed dispersal and resistance to predators and pathogens. Also, they can mediate interactions between organisms such as phytophagous insects and their parasitoids and predators (Knolhoff and Heckel, 2014). These interactions have been cited in a chemical-ecology context for species of Melolonthidae (Coleoptera) and the attraction of adults to plant volatiles has been studied (Loughrin et al., 1995; Reinecke et al., 2002). The adults of *Macrodactylus* sp. ('rose chafers') are beetles of Melolonthidae and feed on leaves, severely damaging flowers and fruits. They are pest of many species such as roses (*Rosa* spp.), grapes (*Vitis* spp.), apples (*Malus* spp.), cherries (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria* spp.) and many other trees, shrubs and cultivated plants (Williams et al., 1990; Arce-Pérez and Morón, 2000). There are many wild and cultivated plants that are visited by *M. nigripes* adults, unfortunately, they are only mentioned as *Macrodactylus* spp., 'rose chafers', 'frailecillos' or 'taches', revealing the lack of taxonomic knowledge. Inversely, *Macrodactylus* species are only mentioned on leaves, on grasses, on flowers or without information of capture. About 66 species of plants in 26 families, have been reported to function as alimentation, aggregation sites and/or reproduction sites for *Macrodactylus* adults. The families of host plants for *Macrodactylus* are Gramineae (50%), Rosaceae (42.30%), Leguminosae (30.76%), Asteraceae and Lauraceae (15.38%), and Pinaceae (11.53%) (Arce-Pérez and Morón, 2000). For Asteraceae, 'seep willow' shrubs are included in *Baccharis* genus, which is represented by 340 species distributed in Brazil, Argentina, Colombia, Chile, and Mexico (Heiden et al., 2012). In the chemical ecology context, there are only three reports in which the plant volatiles of *Baccharis salicifolia* have been studied obtaining by distillation its essential oils (Loayza et al., 1995; Malizia et al., 2005; Carrizo et al., 2009). There are no previous studies about the volatiles of species of seep willows distributed in Mexico.

In the present study, we generated information about the interaction between *B. salicifolia* and *M. nigripes*, an agricultural important species in Mexico (Arce-Pérez and Morón, 2000; Guzmán-Mendoza et al., 2016). In particular, we recorded in field the behavioral responses of *M. nigripes* Bates in presence of seep willows shrubs and we obtained the chemical profile of the leaves of these by solid phase microextraction (SPME) and coupled gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) techniques.

Materials and methods

Study site

The records of the interaction between adults of *M. nigripes* and seep willow shrubs were taken in a semi-disturbed area adjacent to maize crops, located in the municipality of San Pablo del Monte, Tlaxcala, Mexico (19° 07' 00" N and 98° 10' 00" O).

Observational records

Behavior records were performed by means of direct observation (focal and continuous records) (Altmann, 1984). We conducted a total of twenty-four observational sessions, twelve for females (n = 12) and twelve for males (n = 12). Each session lasted 90 minutes and was carried out from 2012 to 2015 between 11:00 and 13:30 hours. We recorded and described the movements, actions and positions of adult females and males in twenty-four seep willows shrubs randomly chosen. Each description begins when the beetles emerges from the soil and finishes when they began to cut up the leaves with the mandibles.

Data analysis

The sequences of behavioral patterns obtained of the interaction between rose chafers and seep willow were measured and flow charts of these sequences were developed. The percentage of times that a particular action pattern follows another (given the first action pattern), and transitions duration were calculated. The principal behavior patterns were described in an ethogram and patterns-transitions sequences were represented in a kinematic diagram.

Leaves volatiles extraction and identification

A directed sampling was conducted to obtain leaves of the same size and healthy appearance from seep willow shrubs. For each extraction, six leaves with same size and weight were introduced on filter-paper at the bottom of the SPME recipient. Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB, 65 µm) fiber coating was used. The holder with the PDMS/DVB fiber coating was placed on the entrance of the upper section for 60 min, capturing the leaves volatiles. We performed a blank experiment for each extraction. For each of the leaves and blank experiments, we performed ten repetitions (n = 10).

The volatiles isolated by SPME were identified in a coupled-gas chromatography 7890B coupled with a high-resolution mass spectrometer Agilent 7200 (Q-TOF), equipped with a HP-5MS 5% phenyl-

methyl-siloxane column, of 30m diameter x 0.25µm of inner diameter. The conditions during this analysis were: 250 °C for the injector temperature, splitless injection mode and helium 1.2 ml/min as the carrying gas. The initial temperature was of 50 °C; it was maintained for 5 minutes until it reached 300 °C at a speed of 10 °C/min.

A spectral comparison of the chromatogram peaks was used to identify the volatile constituents of the leaves. In the mass detector we used chemical ionization with methane to produce ions that were assigned to different chromatogram peaks. Based on the proposed chemical structures from *Pherobase* database and specialized articles, we calculated the exact mass of the detected compounds and the mass/charge difference ($\Delta m/z$) and chemical structures were proposed.

Results

Behavioral records

The behavioral patterns shown by females of *M. nigripes* are shown in Table 1, as well as patterns and transitions sequences are presented in Figure 1. Females emerge from the soil at 11:00 hours and travel in short flights to seep willow shrubs. This movement lasts, on average, 240 secs. Each female settle on the leaf and moves forward and backward for 7 secs, stopping in the superior or posterior leaf margin, positioning itself opposite to the soil and hanging with their legs. Right away, they start moving their abdomen in circles (rotates around its own axis), lifting it in a 45° angle and periodically moving up and down their metatarsus, constantly rubbing them during short periods of time. It has been suggested that this behavior corresponds to the 'calling' in this species (Romero-López et al., 2010). In this position or settling on the leaf margin, the females put their mandibles on the leaf margin and starts moving them from right to left for 82 secs obtaining small leaf fragments to ingest. These mandibles movements could be the feeding behavior of *M. nigripes*. Males emerge from the soil 30 seconds after the females repeating the females' behavior, except for the abdomen movement.

Leaves volatiles identification

We obtained fifteen chromatogram peaks from which ten were related to chemical compounds structures. Each chromatogram peak with its retention time (RT), molecular ion exact mass, error values ($\Delta m/z$) and proposed structure are shown in Table 2. Peak 10 with a retention time of 16.82 minutes was the most intensive peak. We found peaks b1, b2, b3 and b4 also in the blank (Table 2, Figure 2).

Table 1. Description of the basic body movements and behavior patterns of females and males of *Macrodactylus nigripes*.

Behavior pattern	Description
(principal sequence)	
Flight	Direct air displacement towards the leaves of the plant with periodic and constant movements of wings.
Settling on the leaf and recognition	First contact with the leaf. The beetle puts pro-, meso- and metatarsus, as well as the antennae, on the leaf margin.
Movements of mandibles to cut the leaf	Movements of mandibles of right side to left in the opposite direction, cutting the leaf in small fragments
Secondary sequence	
Not directed flight	Air random displacements towards anywhere but leaves
Not movements of mandibles	The mandibles remain immobile. There's no physical contact between mandibles and leaf
Precopulatory behavior	
Calling	The females display abdominal bend and abdominal movements in circles lifting it in 45° angle and periodically moving up and down their metatarsus

Discussion

This is the first study that describes at the same time the feeding behavior and the plant-insect interaction of any Melolonthidae species. Previous studies have only reported these aspects separately. For sexual activity, Romero-López et al. (2007) provided a brief description of the pre-mating behavior of four *Phyllophaga* species on the leaves of *Quercus* sp. Also, has been described the pre-mating behavior of *Phyllophaga obsoleta* Blanchard and some interactions between the adults of this species and leaves of *Bougainvillea* sp. (Romero-López and Arzuffi, 2010). However, both studies do not provide details of the plant-insect interaction. Another studies, tested the preference of *M. nigripes* adults for different chemical stimuli, including *B. salicifolia* leaves using a portable olfactometer (Nieves-Silva and Romero-López, 2016). For plant-insect interactions, Ruther et al. (2002) demonstrated that the volatiles of the host plant of *Melolontha hippocastani* F. combined with a sex pheromone function as attractants of adults of this species. *Baccharis conferta* (Kunth) has been reported as a host plant of *M. nigripes* (Arce-Pérez and Morón, 2000). It is well known that plant species from the same family and genus share about 45-50% of their chemicals (Bottia et al., 2007; Vazquez et al., 2007).

For other hand, in this study has been recorded the presence of cumene in *B. salicifolia* leaves. This chemical compound has also been reported for *Baccharis dentata* (Vell.) (Xavier et al., 2012). The chemicals calamene, α -pinene

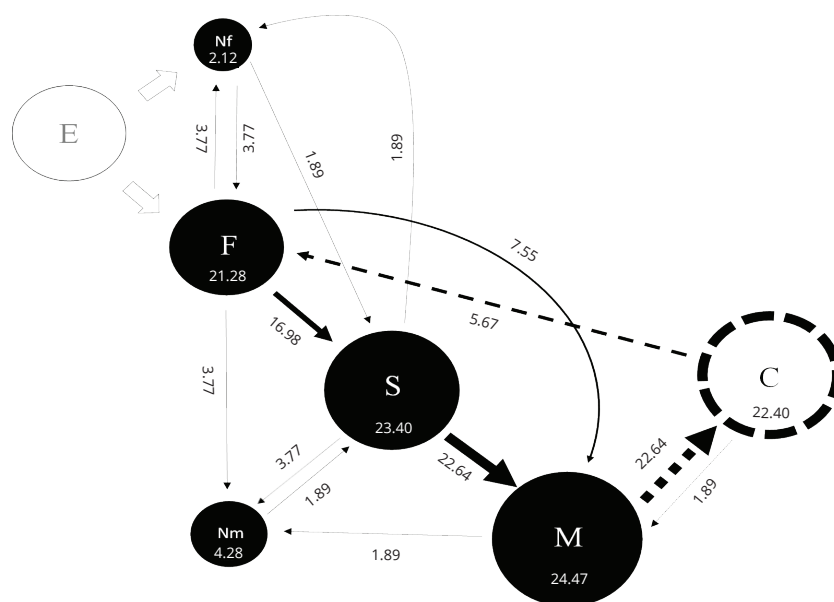


Figure 1. Kinematic diagram of the interactions between females and males of *Macroductylus nigripes* and seep willow plants in field observations.

Circles and arrows represent the behavior patterns and transitions between behavior patterns, respectively. The numbers into circles and the numbers associated with arrows represent observed frequencies (in percentages) of successive behavior patterns and transitions of a complex behavioral sequence. The size of the circles is proportional to the relative frequency of each behavior pattern. The width of the arrow is proportional to the relative frequency of transition.

F= Flight; S= Settling on the leaf and recognition; M= Movements of mandibles to cut the leaf; Nf= Not directed flight; Nm= Not movements of mandibles; C= Calling. White circle= Emergency of females and males from soil / Black circles= Principal behavioral sequence/Dotted line circle= Sexual behavior pattern / White arrow= Transitions after the emergency of females and males from soil/Continue line arrows= Principal transitions behavioral sequence/Dotted line arrows= Connection between interaction plan-insect and sexual behavior transitions

and β -pinene have been previously described for *B. salicifolia* using the hydrodistillation method (Loayza et al., 1995; Malizia et al., 2005; Carrizo et al., 2009; Budel et al., 2018). The use of different techniques to obtain volatile compounds influence in their detection, however, also influence the biotic and abiotic factors and even

the sex of the plant (Drijfhout, 2010; Zuccolotto et al., 2019). The hydrodistillation technique has been used for the extraction of compounds of the genus *Baccharis* for medicinal purposes, but this technique can only extract volatiles carried by water vapor (Salomé-Abarca et al., 2015).

Table 2. Proposed structures for the extracted volatiles of seep willow leaves by SPME and CG-MS.

Volatile compounds	PN	RT (min)	Formula	Experimental mass	Exact mass	$\Delta m/z$
α -pinene	1	8.06	$C_{10}H_{16}$	136.1252	136.1252	0
β -pinene	2	8.12	$C_{10}H_{16}$	136.1252	136.1252	0
1,2,3-trimethylbenzene	3	8.58	C_9H_{12}	120.0938	120.0939	-0.83
2,4- trimethylbenzene						
1,3,5- trimethylbenzene						
cumene	4	9.59	C_7H_8O	108.0575	108.0575	0
phenylmethanol	5	11.99	C_9H_8O	132.0574	132.0575	-0.75
2- phenyl-propenal	6	15.32	C_8H_{14}	110.1095	110.1096	-0.90
ethylidenecyclohexane	7	15.42	$C_{15}H_{22}$	202.1711	202.1721	-4.94
trans-calamenene	8	15.60				
unidentified	9	16.03		95.0856		
trimethylindan	10	16.82	$C_{12}H_{16}$	160.1246	160.1252	-3.74
1,1,4- trimethylindan						
1,1,5- trimethylindan						
1,1,6- trimethylindan						
ciclohexylbenzene	11	19.04	C_8H_8	104.0626	104.0626	0
styrene						

PN= peak number; RT= retention time; $\Delta m/z$ = error values.

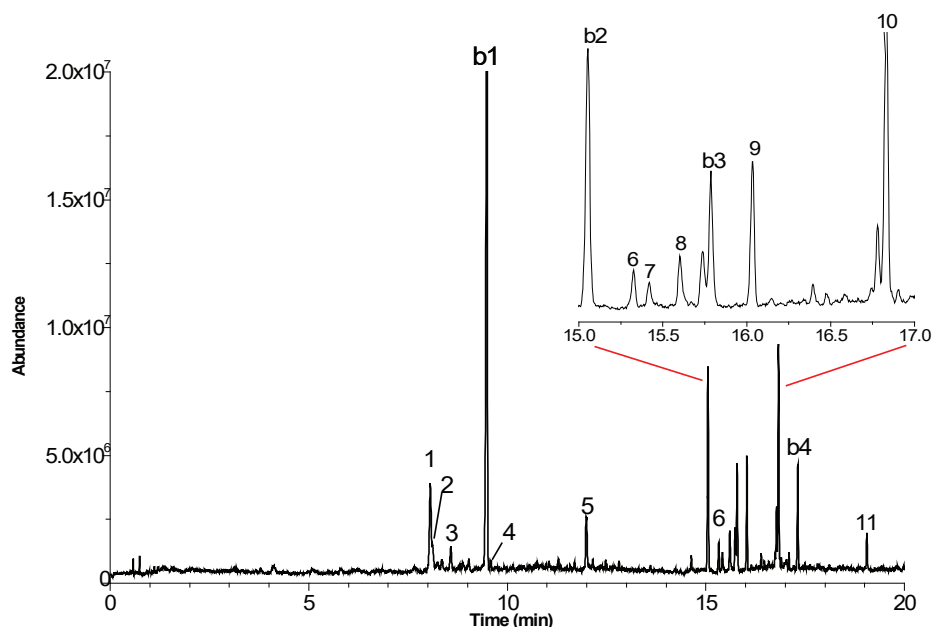


Figure 2. Chromatogram of the volatiles of *Baccharis salicifolia* leaves extracted using the SPME and GC-MS techniques.

In this study we used the SPME which has been reported as the appropriate method for volatile compounds extraction in chemical ecology (Drijfhout, 2010). We also report the presence of phenylmethanol in *B. salicifolia* leaves. This compound has been documented as an attractant of the Melolonthidae species *Holotrichia oblita* Faldermann, *Holotrichia parallela* Motschulsky, *Maladera orientalis* Motschulsky, *Anomala corpulenta* Motschulsky, *Anomala octiescostata* Burmeister and *Popillia quadriguttata* F. (El-Sayed, 2019). Future studies should be focused in proving the biological activity of the phenylmethanol as an attractant of *M. nigripes* and other rose chafer species.

Conclusions

Three principal behavior patterns of females and males of *M. nigripes* interactions with leaves of seep willow were observed: directed flight, settling and mandibles movements to cut leaves, and concurrently the females display a similar behavioral sequence to calling. The most abundant volatile compounds such as trimethylindan, α -pinene, cyclohexylbenzene, as well as phenylmethanol previously reported, could have an important role in the attraction of *M. nigripes*.

Acknowledgements

To VIEP project ROLA-NAT16-I. We extend our gratitude to Laboratorio de Adsorción y Cromatografía de Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, for the extraction of volatile compounds.

References

- Altmann, J. 1984. Observational sampling methods for insect behavioural ecology. *Florida Entomologist*. 67:50-55. DOI:10.2307/3494104.
- Arce-Pérez, R. and Morón, M. A. 2000. Taxonomía y distribución de las especies de *Macroductylus Latreille* Coleoptera:Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana* 79:123-239.
- Bottia, E. J., Díaz, O. L., Mendivelso, D. L., Martínez, J. R. and E. E. Stashenko. 2007. Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Scientia et Technica* 8(33):193-195. <http://dx.doi.org/10.22517/23447214.6167>.
- Budel, J. M.; Wang, M.; Raman, V.; Zhao, J.; Khan S. I.; Rehman, J. U.; Techen, N.; Tekwani, B.; Monteiro, L. M.; Heiden, G.; Takeda, I. J. M.; Farago, P. V. and Khan, I. A. 2018. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. *Molecules*, 23(10):2620. <https://doi.org/10.3390/molecules23102620>.
- Carrizo, R.; Ponzi, M.; Ardanaz, C.; Tonn, C. E. and Donadel, O. J. 2009. Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* Ruiz and Pavon) Pers. and antibacterial activity. *Journal of the Chilean Chemical Society* 54(4):475-476. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072009000400034>.
- Drijfhout, F. 2010. *Chemical Ecology*. In: eLS. John Wiley and Sons, Ltd:Chichester. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003265.pub2>.
- El-Sayed, A. M. 2019. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>.
- Gonzaga, L.; Costa, I. and Geraldo M. 2005. Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos,

- económicos y biológicos. *Química nova*, 28(1):85-94. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100017>.
- Guzmán-Mendoza, R.; Salas-Araiza M. D.; Calzontzi-Marín J.; Martínez-Yáñez R. and Pérez-Moreno L. 2016. Efectos de la fertilización en cultivos de maíz sobre la abundancia y distribución de *Macrodactylus nigripes* Coleóptera:Malolonthidae) de las tierras altas del centro de México. *Acta Universitaria* 26(1):3-11. <http://dx.doi.org/10.15174/au.2016.802>.
- Heiden, G.; Baumgratz, J. F. A. and Esteves, R. L. 2012. *Baccharis* subge. (Molina Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 63(3):649-687. <https://dx.doi.org/10.1590/S2175-78602012000300013>.
- Knolhoff, L. M. and Heckel, D. G. 2014. Behavioral assays for studies of host plant choice and adaptation in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 59:263-278. DOI:10.1146/annurev-ento-011613-161945.
- Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H. and Jean, F. 1995. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry* 38(2):381-389. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00628-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00628-7).
- Loughrin, J. H.; Potter, D. A. and Hamilton-Kemp, T. R. 1995. Volatile compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese beetle *Popillia japonica* Newman. *Journal of Chemical Ecology* 21(10):1457-1467. DOI:10.1007/BF02035145.
- Malizia, R. A.; Cardell, A.; Molli, J. S.; González, S.; Guerra, P. E. and Grau R. J. 2005. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part II: *Baccharis obovata* Hokker et Arnott and *B. salicifolia* Ruiz et Pav.) pers. Species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research* 17(2):194-197. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698873>.
- Nieves-Silva, E. and Romero-López, A. A. 2016. Olfatómetro portátil para el estudio de interacciones en frailecillos Coleoptera (Melolonthidae) y plantas. *Entomología Mexicana* 3:516-522. <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2016/EC/Em%20516-522.pdf>.
- Reinecke, A.; Ruther, J. and Hilker, M. 2002. The scent of food and defense: green leaf volatiles and toluquinone as sex attractant mediate mate finding in the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *Ecology Letters* 5(2):257-263. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00318.x>.
- Romero-López, A. A. and Arzuffi, R. 2010. *Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de un melolóntido mexicano*. En L. A. Rodríguez del Bosque y M. A. Morón Eds. *Ecología y Control de Plagas Edafícolas*. Publicación especial del Instituto de Ecología A.C. pp. 203-222. México. <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000049490>.
- Romero-López, A. A.; Arzuffi, R. and Morón, M. A. Eds. 2010. *Plagas del suelo*. Editorial Mundi-Prensa, México 417 pp.
- Romero-López, A.A.; Aragón, A. and Arzuffi, R. 2007. *Estudio comparativo del comportamiento sexual de cuatro especies de Phyllophaga Coleoptera:Melolonthidae*. En E. G. Estrada, A. Equihua, C. Luna, J.L. Rosas-Acevedo Eds. Sociedad Mexicana de Entomología. *Entomología mexicana* 6:275-281.
- Ruther, J.; Reinecke, A. and Hilker, M. 2002. Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time dependent bouquets and novel function of Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomone. *Ecological Entomology* 27(1):76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.0373a.x>.
- Ruther, J.; Reinecke, A.; Thiemann, K.; Tolasch, T.; Francke, W. and Hilker, M. 2000. Mate finding in the forest cockchafer *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. *Physiological Entomology* 25(2):172-179. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2000.00183.x>.
- Salomé-Abarca, L. F.; Soto-Hernández, R. M.; Cruz-Huerta, N. and González-Hernández, V. A. 2015. Chemical composition of scented extracts obtained from *Calendula officinalis* by three extraction methods. *Botanical Sciences* 93(3):633-638. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.143>.
- Vazquez, A. M.; Goleniowski, M.; Brunetti, P.; Cantero, J. J.; Demmel, M. G.; Criado, S.; Ferrari, M. C. and Aimar, M. L. 2007. Estudio comparativo de la composición química compuestos orgánicos volátiles) por HS-SPME/GC-MS de *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae), micropropagadas y de poblaciones silvestres. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6(5):284-285. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85617508076.pdf>.
- Williams, R. N.; McGovern, T. P.; Klein, M. G. and Fickle, D. S. 1990. Rose chafer Coleoptera: Scarabaeidae):improved attractants for adults. *Journal of Economic Entomology* 83:11-116. <https://doi.org/10.1093/jee/83.1.111>.
- Xavier, V. B.; Vargas, R. M. F.; Cassel, E.; Lucas, A. M.; Santos, M. A.; Mondin, C. A.; Santarem, E. R.; Astarita, L. V. and Sartor, T. 2012. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Industrial Crops and Products* 33(3):599-604. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644129>.
- Zuccolotto, T.; Bressan, J.; Lourenco, A. V. F.; Bruginski, E.; Veiga, A.; Marinho, J. V.N.; Raeski, P. A.; Heiden, G.; Salvador, M. J.; Murakami, F. S.; Budel, J. M. and Campos, F. R. 2019. Chemical, antioxidant, and antimicrobial evaluation of essential oils and anatomical study of the aerials parts from *Baccharis* species Asteracea. *Chemistry and Biodiversity* 16(4). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800547>.

Fertilización con nitrógeno, fósforo, potasio y calcio en mora (*Rubus glaucus* Benth.): Efecto sobre Antracnosis bajo condiciones controladas

Fertilization with nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in blackberry (*Rubus glaucus* Benth.): Effect on Anthracnose under controlled conditions

Luis Gabriel Bautista-Montealegre ^{1*}, Martha Marina Bolaños-Benavides ², Jorge Humberto Argüelles-Cárdenas ³ y Gerhard Fischer ⁴

1. Ingeniero Agrónomo, MSc. Fitopatología Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia. 2. Investigadora Ph.D. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera - Bogotá D.C., Colombia. E-mail: mmbolanos@agrosavia.co. 3. Investigador MSc., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación La Libertad, Km 17 vía Puerto López - Meta, Colombia. E-mail: jarguelles@agrosavia.co. 4. Ingeniero Hortícola, Ph.D. Consultor científico, Investigador Emérito Colciencias, Bogotá D.C., Colombia. E-mail: gerfischer@gmail.com. *Autor de correspondencia: lgbautistam@unal.edu.co

Rec.: 2017-10-16 Acep.: 2019-09-03

Resumen

Para buscar alternativas de manejo de la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth.), en el Centro de Investigación Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA (antes CORPOICA), se realizó un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de los elementos mayores nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) y calcio (Ca) sobre infecciones del hongo *C. gloeosporioides* cepa-52. Para el efecto se utilizó un diseño de bloques completos al azar con un arreglo de tratamientos en un diseño compuesto central ortogonal. Para evaluar la relación de los niveles de fertilización y la severidad de la enfermedad, se hizo una inoculación artificial en tallos de mora de Castilla con espinas, mediante discos de micelio de 0.5 cm a una concentración de 9.53×10^4 conidias. Las observaciones consistieron en: severidad de la enfermedad (S), periodo de incubación (PI) y tasa de desarrollo (r). Los análisis de datos se hicieron por el método de conglomerados sobre la variable severidad, un análisis de correlación de Pearson entre variables, así como una regresión para estimar el efecto de los nutrientes aplicados sobre la severidad de la cepa-52 de *C. gloeosporioides*. Los tratamientos se concentraron en cuatro grupos con los rangos (entre paréntesis) S (15.9% y 91.8%), PI (9 y 15.3) y r (0.0254 y 0.0468). Se observó correlación positiva y significativa entre S y r ($P < 0.001$) y negativa entre PI con S y r ($P < 0.001$). Mediante análisis de regresión se generó un modelo lineal que permitió comprobar la reducción de la severidad de la enfermedad con el incremento de la dosis de N y un incremento con los niveles de P y Ca aplicados.

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*; Mora castilla; nutrición; severidad; tasa de desarrollo; elementos mayores

Abstract

To propose alternatives for management Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in blackberry cultivation, an experiment was performed to estimate the effect of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium on *C. gloeosporioides* strain 52 infections. A randomized complete block design was used with a treatment arrangement corresponding to an orthogonal central composed design. To evaluate the relationship between fertilization levels and the severity of the disease, an artificial inoculation was carried out on blackberry stems with thorns, by 0.5 cm mycelium discs at a concentration of 9.53×10^4 conidia, registered disease severity (S), incubation period (IP) and development rate (r). A cluster analysis was performed on the severity variable, a Pearson correlation analysis between variables, as well as a regression to estimate the effect of the nutrients applied on the severity of strain 52. The treatments were concentrated in four groups with S, IP and r between 15.9% to 91.8%, 9 to 15.3 days and 0.0254 to 0.0468, respectively. Positive and significant correlation was observed between S and r ($P \leq 0.001$), and negative and significant, between IP with S and r ($P < 0.001$). Finally, through the regression analysis, a linear model was generated that allowed us to verify the decrease in severity with the increase in the dose of nitrogen and the increase in this with the growth of phosphorus and calcium levels.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*; Mora castilla; nutrition; severity; development rate.

Introducción

En 2017, los cultivos de mora (*Rubus glaucus* Benth.) en Colombia ocuparon cerca de 14.589 ha, con una producción, promedio, de 123,175 t (MADR, 2018). En el campo fitosanitario, la producción del cultivo se ve amenazada por diversas enfermedades, entre las cuales sobresale la Antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* como la más limitante, ya que genera pérdidas cercanas a 100% del cultivo cuando no se aplican medidas preventivas (Saldarriaga-Cardona et al., 2008).

En Colombia, se ha asociado a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* como agentes causales de Antracnosis en mora, existiendo además reportes sobre el ataque de *C. boninense* (Saldarriaga-Cardona et al., 2008; Afanador et al., 2010, 2014). Las especies de *Colletotrichum* presentan preferencias por los tejidos de la planta, así, *C. gloeosporioides* se asocia en un mayor grado a lesiones en tallo, presentando altas tasas de crecimiento y patogenicidad (Afanador et al., 2010).

El manejo de especies de *Colletotrichum* se ha fundamentado en la aplicación de fungicidas. Este tipo de manejo presenta problemas debido al desarrollo de cepas resistentes (Rupp et al., 2017). El abuso de moléculas químicas para el control de Antracnosis en el cultivo de mora, ha ocasionado el rechazo de pulpas para exportación, debido a trazas encontradas en las mismas (Gaviria-Hernández et al., 2013).

Con base en las consideraciones anteriores, se han estudiado métodos de control para el manejo de la enfermedad mediante la aplicación de productos biológicos como extractos vegetales (Gaviria-Hernández et al., 2013), evaluación de materiales promisorios (López et al., 2013) y la caracterización de germoplasma resistente (Afanador et al., 2010).

En este contexto, la fertilización favorece la reducción de la incidencia y severidad de enfermedades (Huber et al., 2012), debido a factores de resistencia y/o predisposición de las plantas, generados por un desequilibrio nutricional (Chaboussou, 1967). En este sentido, las deficiencias nutricionales pueden aumentar la susceptibilidad a diversas enfermedades (Velasco, 2000), mientras que infecciones débiles pueden llegar a tornarse más agresivas (McMahon, 2012).

El nitrógeno (N) ha sido el elemento más estudiado en relación con la nutrición del huésped y la prevalencia de enfermedades, teniendo en cuenta su esencialidad en el crecimiento de las plantas, su limitada disponibilidad en el suelo y su efecto en el tamaño de las células

y el espesor de la pared celular (Huber y Thompson, 2007; Walters y Bingham, 2007). Adicionalmente, juega un papel fundamental en la interacción planta - patógeno, debido a la movilidad del elemento durante el estrés biótico y abiótico como estrategia de defensa de la planta (Tavernier et al., 2007).

Por su parte, el fósforo (P) incrementa la resistencia de las plantas a diferentes enfermedades, cuando su concentración en los tejidos acelera la madurez y protege los órganos jóvenes; no obstante, los efectos sobre la severidad de enfermedades no son tan evidentes cuando se observa en cultivares susceptibles y/o moderadamente resistentes (Prabhu et al., 2007).

El potasio (K) es el soluto inorgánico más abundante en las células vegetales y está relacionado con la respuesta de la planta a estreses abióticos y bióticos (Zhou et al, 2014) y su deficiencia causa la reducción en la síntesis de proteínas, almidón y celulosa (compuestos de alto peso molecular) y por tanto, induce la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que pueden cubrir nutrientes requeridos por los microorganismos (Huber et al., 2012).

Diversos hongos invaden los tejidos de las plantas por la producción de enzimas pectolíticas, tales como poligalacturonasa, que disuelven la laminilla media de las células, sin embargo, la actividad de esta enzima puede ser inhibida cuando aumenta la concentración de calcio (Ca) en los tejidos, a la vez que contribuye en la formación de barreras físicas protectoras frente a la penetración de dichos organismos (Spann y Schumann, 2010).

De acuerdo con las anteriores consideraciones, el objetivo de la presente investigación fue evaluar en condiciones de invernadero el efecto de la fertilización con N, P, K y Ca sobre el desarrollo de *C. gloeosporioides* cepa-52 en plantas de mora de Castilla con espinas.

Materiales y métodos

Localización

El experimento se realizó en el invernadero del Centro de Investigación Tibaitatá, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA (antes CORPOICA), situado en el kilómetro 14, vía Bogotá - Mosquera, a 2600 m.s.n.m., en el departamento de Cundinamarca, a 4° 42' de latitud norte y 74° 12' longitud oeste, con una temperatura promedio de 13.1°C, humedad relativa de 80%, a 2.600 m.s.n.m.

Aplicación de tratamientos

A partir de estudios de fertilización adelantados por Vayas (2000) y Artunduaga (2010), se definieron y aplicaron 25 tratamientos con diferentes dosis de los nutrientes N, P, K y Ca (Tabla 1) en plántulas con espinas de mora de Castilla y uniformidad fenotípica de 10 meses de edad, las cuales fueron propagadas sexualmente y sembradas en bolsas plásticas con 1500 g de sustrato, compuesto por una mezcla de turba y cascarilla de arroz, en relación 3:1. La cantidad total de los elementos por tratamiento se dosificó semanalmente, preparando soluciones nutritivas a partir de ácido nítrico, cloruro de calcio dihidratado, cloruro de potasio, difosfato de amonio, sulfato de magnesio heptahidratado, nitrato de calcio tetrahidratado, nitrato de potasio, sulfato de potasio e hidróxido de sodio, conservando las concentraciones originales de Mg, S y microelementos de la solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950).

Tabla 1. Composición de los tratamientos aplicados a plántulas de mora Castilla inoculadas con la cepa 52 de *C. gloeosporioides*. C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

Tratamiento (no.)	Nutriente aplicado (g/planta)			
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO
1	16	12	24	12
2	48	12	24	12
3	16	57	24	12
4	48	57	24	12
5	16	12	72	12
6	48	12	72	12
7	16	57	72	12
8	48	57	72	12
9	16	12	24	28
10	48	12	24	28
11	16	57	24	28
12	48	57	24	28
13	16	12	72	28
14	48	12	72	28
15	16	57	72	28
16	48	57	72	28
17	9	35	48	20
18	55	35	48	20
19	32	3	48	20
20	32	66	48	20
21	32	35	14	20
22	32	35	82	20
23	32	35	48	9
24	32	35	48	31
25	32	35	48	20

Inoculación del patógeno

En la inoculación se empleó la cepa-52 de *C. gloeosporioides* aislada de tallos de mora de Castilla, la cual fue caracterizada morfológica y molecularmente por AGROSAVIA en 2012 (Saldarriaga et al., 2012). Esta cepa corresponde a un aislamiento obtenido de tallos de mora del genotipo San Antonio, recolectado en el departamento de Antioquia (Colombia) y sobre la cual se reportan severidades por *C. gloeosporioides* entre 10% y 100%, después de 19 a 55 días de la siembra. La reactivación se realizó en medio de cultivo PDA en los laboratorios de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá. Cincuenta y tres días después del comienzo del experimento (DDCE), se llevó a cabo una inoculación artificial del hongo sobre los tallos, con discos de micelio a una concentración de 9.53×10^4 conidias.

Evaluación de la enfermedad

Para esta evaluación se elaboró una escala diagramática de severidad en tallos de mora (Figura 1) utilizando como referencia la escala propuesta por López et al. (2013), mediante la cual se estimó la severidad de la enfermedad (S) con la ecuación siguiente (Ecuación 1):

$$S (\%) = \frac{\sum(n*b)}{N} \quad \text{Ec.1}$$

Donde: S (%) = severidad de la enfermedad expresada en el porcentaje de tejido afectado. n = número de unidades de muestreo clasificadas en cada grado. b = grado de severidad. N = número total de unidades de muestreo observadas.

Una vez identificada la S, se calculó la tasa de desarrollo de la enfermedad (r) mediante la ecuación siguiente (Castaño-Zapata, 2002):

$$r = \frac{1}{t_1 - t_0} \left(\text{Log}_e \frac{X_1}{1 - X_1} - \text{Log}_e \frac{X_0}{1 - X_0} \right) \quad \text{Ec.2}$$

Dónde: r = tasa de desarrollo, t_1 = tiempo final, t_0 = tiempo inicial, X_1 = severidad final, X_0 = severidad inicial.

Con los datos obtenidos se calculó el periodo de incubación (PI), definido como el número de días transcurridos desde la inoculación hasta que los tallos de las plantas presentaron síntomas de Antracnosis, los cuales se manifestaron por la presencia de manchas de color morado a café oscuro y bordes oscuros sobre el tejido inoculado.

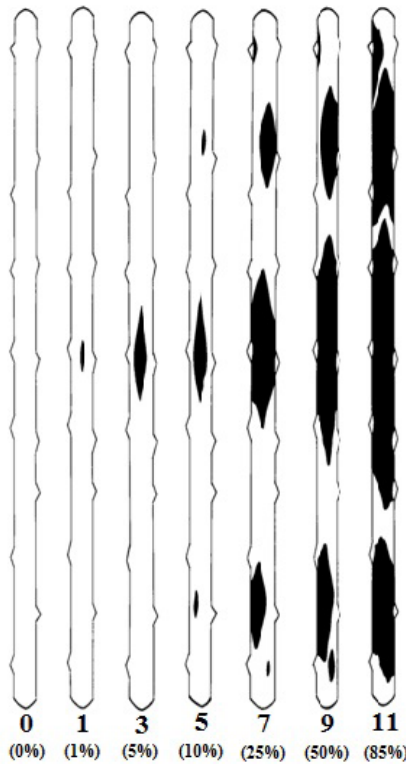


Figura 1. Escala de severidad de antracnosis propuesta y utilizado, para tallos de mora inoculados con discos de agar (modificado de López et al., 2013). 0: Sin lesión aparente o 0% del tejido afectado. 1: 1% del tejido afectado. 3: 5% del tejido afectado. 5: 10% del tejido afectado. 7: 25% del tejido. 9: 50% del tejido afectado. 11: 85% del tejido afectado. C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con un arreglo de tratamientos en un diseño compuesto central ortogonal y tres repeticiones, para un total de 375 plántulas (25 x 5 x 3). Se realizó un análisis de conglomerados para la variable severidad, utilizando el procedimiento Cluster del software Statistical Analysis System (SAS® 9.3), con el fin de clasificar los tratamientos en grupos homogéneos. Se analizó el nivel de asociación entre las variables severidad (S), tasa de desarrollo (r) y periodo de incubación (PI), mediante coeficiente de correlación de Pearson verificando relaciones positivas o negativas y grado de significancia ($P < 0.001$). Para estimar el efecto de los niveles de fertilización sobre la severidad de la enfermedad, se empleó un análisis de regresión y se construyeron las gráficas respectivas mediante el software libre R (R Foundation for Statistical Computing).

Resultados y discusión

Efecto de los tratamientos

El análisis de conglomerados permitió clasificar los tratamientos en cuatro grupos de acuerdo con los estadísticos propuestos (Figura 2 y Tabla 2). De acuerdo con lo anterior, los grupos presentaron una S comprendida entre 15.9% y

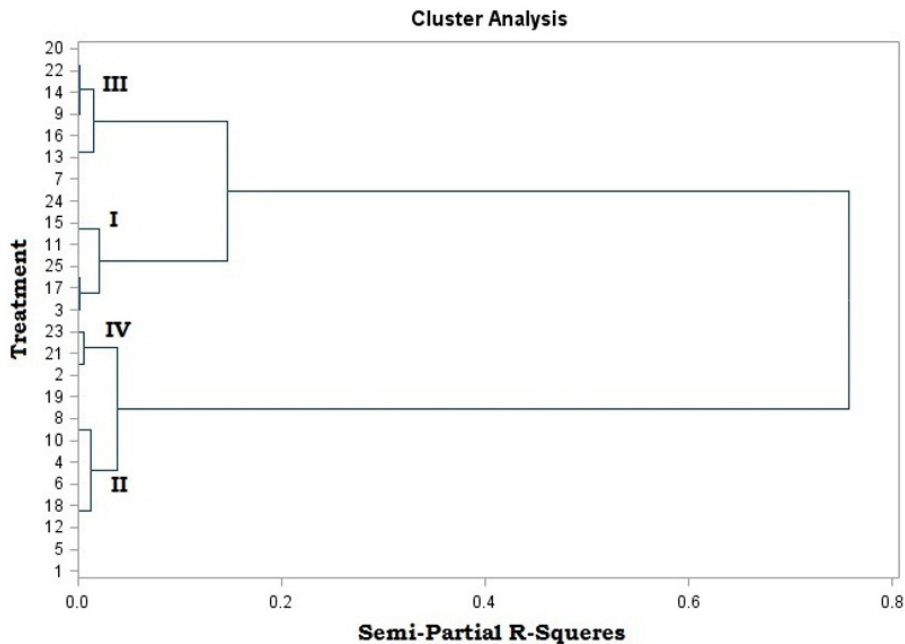


Figura 2. Agrupamiento de tratamientos aplicados a plántulas de mora basado en la evaluación de severidad, periodo de incubación y tasa de desarrollo de la cepa 52 de *C. gloeoporioides*. C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

Tabla 2. Agrupamientos de severidad (S), periodo de incubación (PI) y tasa de desarrollo de la enfermedad (r) de la cepa 52 de *C. gloeosporioides* inoculada sobre tallos de mora. C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

Grupos	Tratamiento (no.)	Dosis (g/planta)				Variable	Media	C.V.
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO			
1	3	16	57	24	12	S	91.8	9.6
	11	16	57	24	28			
	15	16	57	72	28			
	17	9	35	48	20	r	0.0468	0.0
	24	32	35	48	31	PI	9.0	18.5
	25	32	35	48	20			
2	1	16	12	24	12	S	33.5	16.5
	4	48	57	24	12			
	5	16	12	72	12			
	6	48	12	72	12			
	8	48	57	72	12	r	0.0281	7.4
	10	48	12	24	28	PI	14.4	31.5
	12	48	57	24	28			
	18	55	35	48	20			
19	32	3	48	20				
3	7	16	57	72	12	S	62.9	11.3
	9	16	12	24	28			
	13	16	12	72	28			
	14	48	12	72	28	r	0.0368	10.0
	16	48	57	72	28	PI	14.1	29.2
	20	32	66	48	20			
	22	32	35	82	20			
2	48	12	24	12				
4	21	32	35	14	20	r	0.0254	6.6
	23	32	35	48	9	PI	15.3	35.9

91.8%, un r entre 0.0254 y 0.0468 y un PI entre 9 y 15.3 días (Tabla 2). En el grupo 1 (G1) se ubicaron seis tratamientos que presentaron los valores medios más altos de S y r, así como el valor medio más bajo para PI. La mejor respuesta sobre las variables evaluadas se observó en el grupo 4 (G4), compuesto por tres tratamientos; mientras que en los grupos 2 (G2) y 3 (G3) se agruparon nueve y siete tratamientos, respectivamente; con valores S entre 33.5 y 62.9, PI entre 14.1 y 14.4 y r entre 0.0281 y 0.0368 (Tabla 2 y Figura 2).

Desarrollo de la enfermedad

Durante el desarrollo del trabajo en invernadero, se presentó una temperatura promedio de 19 °C y humedad relativa de 71%. Previa inoculación con la cepa-52 de *C. gloeosporioides*, 53 DDCE, la temperatura promedio fue de 19 °C y disminuyó

a 18 °C a partir de los 62 DDCE, mientras que la humedad relativa en ambos periodos fue, en promedio, de 57%. Investigaciones en condiciones de campo mostraron que las temperaturas aproximadas de 16 °C y humedad relativa superior a 85%, son apropiadas para el incremento de las lesiones de Antracnosis en el cultivo de mora (Forero de La-Rotta et al., 2001), lo cual difiere de los datos registrados en el presente trabajo.

No obstante, estudios en campo con materiales de mora expuestos a inoculaciones naturales con *C. gloeosporioides* (López et al., 2013) no muestran interacciones entre el desarrollo de la enfermedad y el porcentaje de humedad ambiental, lo cual concuerda con los resultados observados en la presente investigación, ya que no se registran los valores reportados en la epidemiología del

patógeno. En las investigaciones antes citadas se registró una humedad relativa de 76.34%, con valores mínimos y máximos de 63.6% y 87%, respectivamente, condiciones en las cuales los genotipos susceptibles a Antracnosis manifestaron severidad entre 45.6% y 50% e incidencia entre 79.8% y 99.4%.

El análisis de correlación de Pearson mostró correlación positiva y significativa entre S y r ($P < 0.001$), y negativa y significativa, entre PI con S y r ($P < 0.001$) (Figura 3), lo cual indica que al aumentar la severidad de la enfermedad, se incrementa la tasa de desarrollo; mientras que al aumentar el periodo de incubación disminuyen la severidad y la tasa de desarrollo.

Las curvas de desarrollo de la enfermedad en los grupos identificados (Figura 4), permitieron observar en el G1 un crecimiento exponencial hasta los 40 días después de la inoculación (DDI), seguido de un crecimiento lineal hasta el final del experimento (64 DDI) en todas las plantas de mora que recibieron los tratamientos de fertilización (T), excepto en aquellas plantas de los T15 y T24. Dichos tratamientos presentaron un crecimiento exponencial hasta los 32 DDI, el cual pasó a lineal 48 DDI y se estabilizó al llegar a 100% de severidad 110 DDI (Figura 4).

En las plantas incluidas en los G2 y G3 se observó un crecimiento exponencial hasta 40 DDI pasando a lineal hasta 64 DDI, excepto para los T5 y T7 en los G2 y G3, respectivamente. En este sentido, el desarrollo de la enfermedad en el T5 presentó un crecimiento logístico a partir de 8 DDI hasta el final de las evaluaciones, mientras que el T7 presentó un crecimiento exponencial hasta 32 DDI, el cual se tornó lineal y estable entre los 56 y 64 DDI (Figura 4).

En el G4 el desarrollo de la enfermedad en las plantas que recibieron los tratamientos de fertilización T2 y T21, presentó un crecimiento exponencial a partir de 16 DDI hasta el final de las evaluaciones, mientras que la enfermedad en las plantas del T23 mostró un crecimiento logístico desde 40 DDI, el cual no superó 10% de severidad 64 DDI (Figura 4).

De acuerdo con los nutrientes aplicados, los tratamientos del G1 recibieron dosis de todos los elementos, con excepción de N, K y Ca en los T17, T15, T3 y T24, respectivamente. Por otra parte, en el grupo que presentó la mejor respuesta (G4) se observó una mayor variabilidad de las dosis aplicadas, ya que solo hubo coincidencia para N y P en los T21 y T23, presentándose a la vez la menor dosis de Ca en el T23 (Tabla 2).

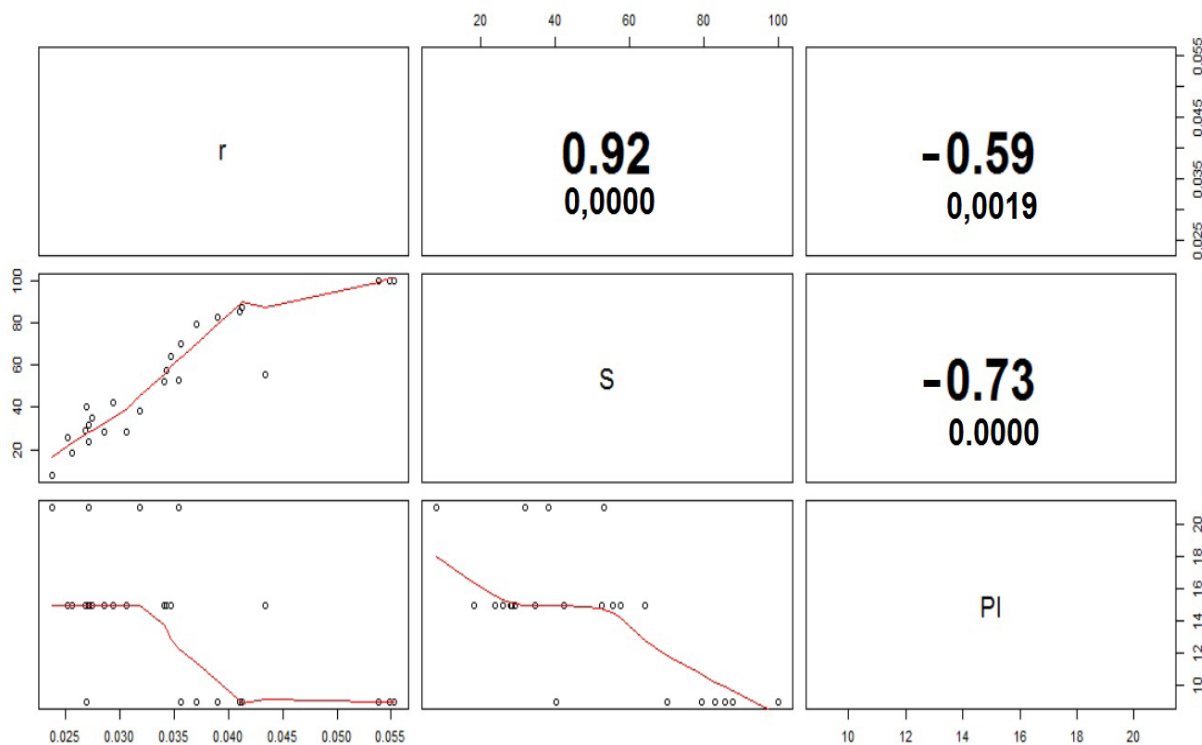


Figura 3. Relaciones entre tasa de desarrollo (r), severidad (S) y periodo de incubación (PI) en plantas de mora inoculadas con de la cepa 52 de *C. gloeoporioides*. C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

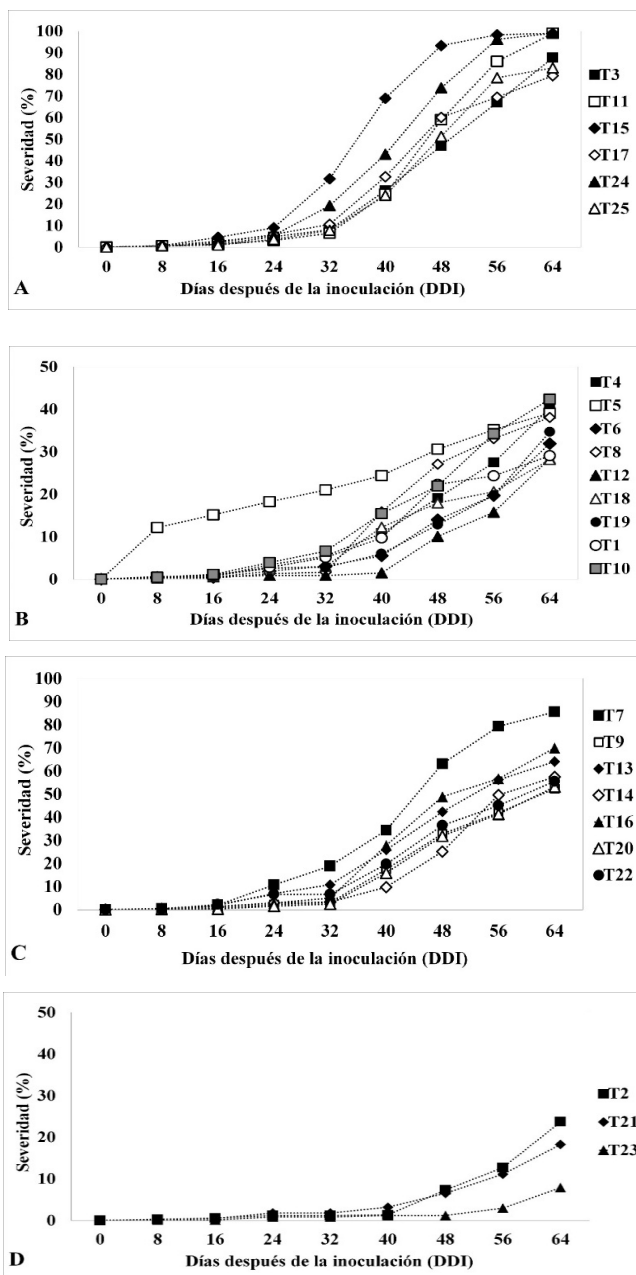


Figura 4. Curvas de desarrollo de *C. gloeosporioides* cepa-52 sobre tallos de mora en los grupos: 1 (A), 2 (B), 3 (C) y 4 (D). C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

Efecto de los nutrientes

Bajo las condiciones del presente estudio, el análisis de regresión permitió ajustar un modelo lineal múltiple (Ecuación 3), donde el N tiene un efecto negativo sobre la severidad de la enfermedad, es decir, con el aumento de 1 g del elemento, se espera un descenso de 0.881% de ésta. Para P y Ca, se observó el efecto contrario (positivo), o sea, al aumentar el contenido de estos nutrientes en 1 g, ocurren incrementos de 0.054% y 1.773% en la severidad de la enfermedad, respectivamente (Figura 5).

$$\text{Severidad} = 27.371 - 0.881N + 0.054P + 1.773Ca \quad R^2 = 0.5922 \quad \text{Ec. 3}$$

Los resultados con la aplicación de N difieren de los hallazgos de Nam et al. (2006), quienes encontraron que concentraciones elevadas de este elemento incrementan la severidad de *C. gloeosporioides* sobre plantas de fresa (*Strawberry* cv. Nyoho); lo que a su vez demuestra una marcada diferencia en los procesos de interacción entre los patógenos y hospederos bajo condiciones de desbalance nutricional. En este contexto, algunos patógenos foliares penetran, se multiplican y desarrollan en tejidos suculentos gracias al aporte del nitrógeno (van Bruggen et al, 2016).

Con base en lo anterior, se han propuesto manejos de enfermedades mediante la reducción de las aplicaciones de N, sin embargo, estos procedimientos exponen las plantas a deficiencias y desbalances nutricionales, debido a patrones fisiológicos de las interacciones planta-patógeno, ya que generalmente la forma de N disponible para el huésped o el microorganismo, tiene mayor influencia que la cantidad del elemento aplicado (Huber y Thompson, 2007).

El efecto de P en la reducción de enfermedades es atribuido a procesos fisiológicos que conllevan a los tejidos jóvenes a infecciones por la maduración los órganos; sin embargo, el efecto no es notorio cuando se observa en cultivares susceptibles y/o moderadamente resistentes (Prabhu et al., 2007); lo cual coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación, si se considera la alta patogenicidad de la cepa utilizada (Saldarriaga et al., 2012), la susceptibilidad del material empleado, así como reportes sobre la influencia del elemento en el incremento de enfermedades causadas por diversos patógenos (Prabhu et al., 2007).

A pesar del efecto positivo del Ca en el manejo de enfermedades y su mecanismo de acción sobre los patógenos (He et al., 2014), en el presente estudio se pudo inferir que el incremento de este elemento contribuyó al aumento de la severidad de la cepa-52 de *C. gloeosporioides*. En este sentido, estudios moleculares muestran efectos negativos del Ca en las fases tempranas de la infección por *C. gloeosporioides*, tales como la germinación de conidias y la formación de apresorios.

No obstante, estudios realizados por Ahn et al. (2003) demostraron que la adición exógena de CaCl_2 restaura la germinación de conidias y la formación de apresorios, esto debido en gran medida a la expresión del gen calmodulina

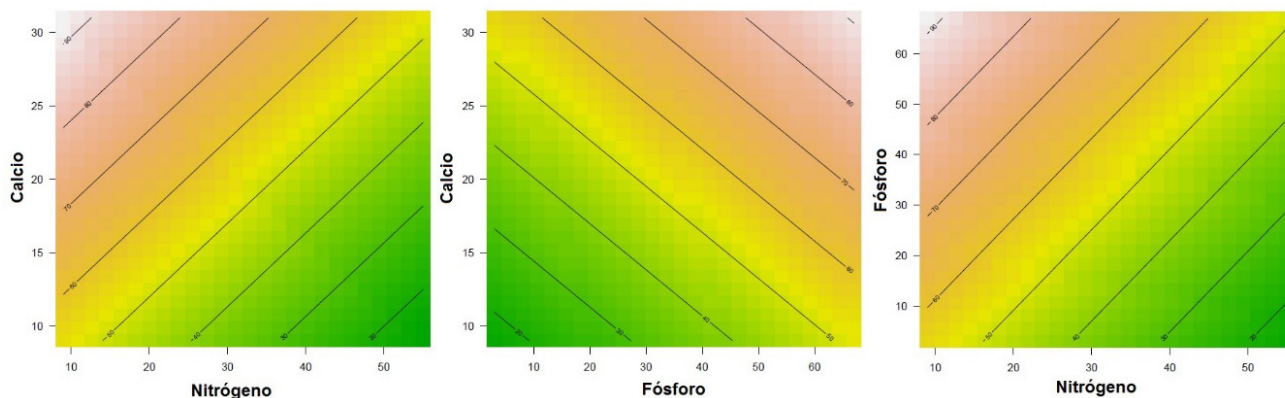


Figura 5. Gráfica de contornos para el modelo lineal múltiple del efecto de N, P y Ca sobre el porcentaje de severidad de *C. gloeosporioides* cepa-52 en tallos de mora. C.I. Tibaitatá, AGROSAVIA (antes CORPOICA), Colombia.

(CgCaM), el cual fue codificado mediante métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e identificación del ADN genómico, como un regulador de los procesos bioquímicos y estructurales de *C. gloeosporioides*.

Aunque en el presente estudio no se evidenció un efecto significativo del K sobre la severidad de la enfermedad, es conocido que desbalances de este elemento influyen procesos fisiológicos y bioquímicos que tienen relevancia para la susceptibilidad de las plantas a patógenos. En este contexto, este nutriente induce respuestas de defensa microscópica en los tejidos, tales como la acumulación de compuestos de tipo fenólico y la formación de barreras antifúngicas (Araujo et al., 2015). No obstante, el aumento excesivo en la concentración de potasio no tiene efecto sobre la síntesis de compuestos de alto peso molecular ni un efecto adicional sobre la resistencia y/o tolerancia; ya que la adición del elemento sólo es eficiente en el control de enfermedades solo si se cubre su deficiencia (Huber et al., 2012).

Conclusiones

Dosis de 32, 35, 48 y 9 g/planta de N, P, K y Ca, respectivamente, aplicadas a plantas de mora Castilla, causaron reducción de la severidad y la tasa de desarrollo de la cepa-52 de *C. gloeosporioides* e incrementaron el periodo de incubación del hongo. Se observó una reducción en la severidad de la enfermedad con el incremento de las dosis de N y el aumento de ésta con el incremento de los niveles de P y Ca.

Los resultados del estudio mostraron la interacción entre plantas de mora Castilla y la cepa-52 de *C. gloeosporioides*, agente causal de Antracnosis bajo condiciones de desbalances nutricionales, resultados que posiblemente fueron afectados por la susceptibilidad del material vegetal utilizado y la alta patogenicidad de la cepa-52.

Agradecimientos

Este trabajo hace parte del Proyecto Requerimientos Nutricionales (N, P, K y Ca) del Cultivo de Mora (*Rubus glaucus* B.) financiado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá.

Referencias

- Afanador, L.; Álvarez, E.; y González, A. 2010. Antracnosis de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.): Variabilidad en especies y razas del agente causante e identificación de fuentes de resistencia a la enfermedad. In: Centro de Agricultura Tropical - CIAT. Proyecto Productores de lulo y mora competitivos mediante selección participativa de clones elite, manejo integrado del cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor. Fontagro mora lulo. Palmira: Colombia. p. 66-84.
- Afanador, L.; González, A.; Gañán, L.; Mejía, J.; Cardona, N.; y Álvarez, E. 2014. Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Dis.* 98:503-1513.
- Ahn, II.; Kim, S.; Choi, W.; y Lee, Y. 2003. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by polyamines in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting red pepper. *FEMS Microbiol Lett.* 227:237-241.
- Araujo, L.; Bispo, W. M. S.; Rios, V. S.; Fernandes, S. A.; y Rodrigues, F. A. 2015. Induction of the phenylpropanoid pathway by acibenzolar-s-methyl and potassium phosphite increases mango resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. *Plant Dis.*, 99:447-459. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0788-RE>
- Castaño-Zapata, J. 2002. *Principios básicos de fitoepidemiología*. Centro Editorial, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Chaboussou, F. 1967. La trophobiose ou les rapports nutritinnels entre la Plante-hôte et ses parasites. *Ann Soc Ent Fr*, 3 (3):797-809.

- Forero de la Rotta, M. 2001. *Enfermedades de la mora castilla*. Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Bogotá.
- Gaviria-Hernández, V.; Patiño-Hoyos, L.; y Saldarriaga-Cardona, A. 2013. In vitro evaluation of commercial fungicides for control of *Colletotrichum* spp., in blackberry. *CORPOICA Cienc. Tecnol. Agropecu.*, 14 (1):67-75.
- He, K.; Yang, S.; Li, H.; Wang, H.; y Li, Z. 2014. Effects of calcium carbonate on the survival of *Ralstonia solanacearum* in soil and control of tobacco bacterial wilt. *Eur J Plant Pathol.*, 140, 665–675. DOI: 10.1007/s10658-014-0496-4
- Huber, D.; y Thompsom, I. 2007. *Nitrogen and plant disease*. In: Datnoff, L., Elmer, W. y Huber, D. (Ed). *Mineral nutrition and plant disease*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. p. 31-43.
- Huber, D.; Römheld, W.; y Weinmann, M. 2012. *Relationship between nutrition, plant diseases and pests*. In: Marschner, P. (Ed). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. (Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. p. 283-298.
- López, J.; Castaño-Zapata, J.; Marulanda, M.; y López, A. 2013. Caracterización de la resistencia a antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y productividad de cinco genotipos de mora (*Rubus glaucus* Benth.). *Acta Agron.*, 62:174-105. DOI: 0.1186/1471-2229-14-154.
- McMahon, P. 2012. Effect of nutrition and soil function on pathogens of tropical tree crops. In: Cumagun, C. (Ed). *Plant Pathology*. 243-272. InTech. DOI: 10.5772/32490. <https://www.intechopen.com/books/plant-pathology/effect-of-nutrition-and-soil-function-on-pathogens-of-tropical-tree-crops>.
- MADR – Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2018. Anuario estadístico del sector agropecuario 2017.
- Nam, H.; Jeong, S.; Lee, Y.; Choi, M.; y Kim, H. 2006. Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose. *Plant Pathol.*, 55:246-249.
- Prabhu, A.; Fageria, N.; y Berni, R. 2007. *Phosphorus and plant disease*. In: Datnoff, L., Elmer, W., & Huber, D. *Mineral nutrition and plant disease*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. p. 45-55.
- Rupp, S.; Weber, R.; Rieger, D.; Detzel, P.; y Hahn, M. 2017. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German. *Horticulture. Front. Microbiol.*, 7(2075):1-12. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02075
- Saldarriaga, A.; Navas, G.; Navas, A.; Franco, G.; Ríos, G.; Vásquez, L.; Londoño, M.; Macías, A.; Hincapié, M.; Gómez, E.; González, S.; Gaviria, V.; Arango, R.; Cañas, G.; Rueda, N.; Ochoa, M.; Salamandro, C.; Osorio, J.; Martínez, E.; Climaco, J.; Forero, C.; Abaunzá, C.; González, A.; Segura, J.; Gómez, R.; y Palacios, X. 2012. *Proyecto Biología, caracterización y comportamiento del patógeno de antracnosis de la mora (Rubus glaucus Benth.), como base para establecer estrategias de manejo*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA. Rionegro, Colombia.
- Saldarriaga-Cardona, A.; Castaño-Zapata, J.; y Arango-Isaza, R. 2008. Caracterización del agente causante de antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Físicas Natur.*, 32(123):145-156.
- Spann, T. y Schumann, A. 2010. *Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance*. The Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <https://edis.ifas.ufl.edu/hs1181>
- Tavernier, V.; Cadiou, S.; Pageau, K.; Lauge, R.; Reisdorf-Cren, L.; Langin, T.; y Masclaux-Daubresse, C. 2007. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J Exp. Bot.* 58(12):3351-3360.
- van Bruggen, A.; Gamliel, A.; y Finckh, R. 2016. Plant disease management in organic farming systems. *Pest Manag Sci.* 72: 30–44. DOI: 10.1002/ps.4145
- Velasco, V. 2000. Role of mineral nutrition on plant disease tolerance. *Terra*, 17(3), 193-200.
- Walters, D.; y Bingham, I. 2007. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Ann. Appl. Biol.* 151:307–324.
- Zhou, L.; He, H.; Liu, R.; Han, Q.; Shou, H.; y Liu, B. 2014. Overexpression of GmAKT2 potassium channel enhances resistance to soybean mosaic virus. *BMC Plant Biology.* 14(154):1-11.

Electrochemical quantification of chlorpyrifos in white (*Allium cepa* L.) and green (*Allium fistulosum* L.) onions

Cuantificación voltamétrica de clorpirifos en cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) y cebolla de rama (*Allium fistulosum* L.)

José Mauricio García Colmenares¹, Leidy Paola Pérez Cepeda² y Sandra Patricia Chaparro Acuña³

Rec.: 2018-10-10 Acep.: 2019-07-18

1. Químico de Alimentos. Grupo de investigación en Química Ambiental. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. E-mail: mahogc07@hotmail.com. 2. Estudiante de Maestría en Química. Instituto de Química. Universidad de Sao Paulo. Brasil. E-mail: lpaolapc@usp.br. 3. Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Grupo de investigación en Catálisis. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. *Autor para correspondencia: patricia.chaparro@uptc.edu.co

Abstract

The Linear sweep voltammetry method (LSP) of a common pesticide such as chlorpyrifos (CP) an organophosphate pesticide (OPP) in white (*Allium cepa* L.) and green onions (*Allium fistulosum* L.) was investigated. A hanging mercury drop electrode (HMDE) Ag/AgCl was used as reference electrode and platinum as a counter electrode. The OPP was extracted from the onion through liquid-liquid partition using acetone/dichloromethane as the solvent. Validated method was compared with GC/ECD as a reference method. CP concentration was not different between the two analytical techniques; the analysis was performed with a confidence level of 90%, corresponding to the polarographic method. CP concentration was 0.8400 ± 0.062 ppm in *Allium cepa* and 0.062 ± 0.300 ppm in *Allium fistulosum* L. These values exceed the ADI and ARD values for chlorpyrifos established by current regulations.

Key words: Chlorpyrifos; Linear Sweep Polarography; onion; organophosphates

Resumen

En el trabajo se cuantificó la concentración de clorpirifos (CP), un plaguicida organofosforado (POF) en cebolla de bulbo (*Allium cepa*) y en cebolla de rama (*Allium fistulosum* L.) utilizando el método polarográfico de barrido lineal (LSP). El estudio fue realizado usando como buffer solución Britton-Robinson, electrodo de trabajo gota estática de mercurio (HMDE) Ag/AgCl como electrodo de referencia y platino como electrodo auxiliar. El POF en cebolla se extrajo por reparto líquido-líquido, utilizando acetona/diclorometano como solvente. El método polarográfico validado fue comparado con GC/ECD, como validación de referencia. La concentración de CP determinada por ambas técnicas de análisis no presentó diferencia significativa ($P > 0.01$), correspondiente al método polarográfico. La concentración de CP en cebolla junca (*Allium cepa*) fue calculada en 0.8400 ± 0.062 ppm y en la cebolla cabezona (*Allium fistulosum* L.) en 0.062 ± 0.300 ppm, estos valores sobrepasan el LMR y el IDA, establecidos por la normativa vigente (FAO/OMS, 2000, 2006).

Palabras clave: Clorpirifos; Cebolla; Organofosforados; Polarografía de Barrido Lineal

Introduction

Organophosphorous pesticides (OPP), most of which are esters and thioesters of phosphoric and thiophosphoric acids are widely used throughout the world (Chang, et al., 2009). Chlorpyrifos (O,O-Diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate) (CP) is an OPP that has been extensively applied in agricultural and household pest control since 1965 (Centner, 2018). They have applied in Boyacá (Colombia) for agricultural pest control in onion, tomato and potato crops. They enter freshwater and saltwater ecosystems primarily as spray drift and it can produce residues on agricultural products, contamination of soils and aquatic environments. The Environmental Protection Agency of the United States (EPA) and the World Health Organization (WHO) have determined that these pesticides are mutagenic rate risks and reproductive effects and fetotoxicity, classifying them as 1b (highly hazardous), and included in the Prior Informed Consent (PIC) Procedure (ICP, Rotterdam Convention) which applies to highly dangerous pesticides to human health (EPA, 1996). FAO (1986) sets maximum allowable concentrations of each type of OPP, for CP the acceptable daily intake is 0-0.01 mg/kg body weight. The excessive use of pesticides creates negative consequences for ecosystems, farmers and consumers, and highly residual foods such as tomatoes, potatoes, spinach and lettuce where most pollutants are stored (Del Puerto, et al., 2014). This widespread use poses a potential risk to human health because OPPs inhibit acetyl cholinesterase and lead to the modification of cholinergic signaling (Pope, et al., 2005). CP is dangerous for infants, young children and pregnant women (Silver, et al., 2017). It can cause developmental disorders, autoimmune disorders, and increase probability of chromosomal aberrations (Li, et al., 2015). Therefore, there is a growing interest in quantifying CP residues in agricultural products and foods all over the world.

Chlorpyrifos has been analyzed using a wide range of different analytical techniques, such as High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Otieno, et al., 2013), Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (Bauer, et al., 2018; Rai, et al., 2016), infrared micro-imaging (Li, et al., 2012.) and electrochemical detection on different electrode surfaces (Chen, et al., 2017).

White onion (*Allium cepa* L.) is an important crop in the world due to its diverse uses. Its bulb is used raw, sliced in salads or as ingredient in various traditional dishes with meat or vegetables (Moghbeli, et al., 2019). About 93 million tons of onions were produced in 4.9 million hectares in the world (FAO, 2016). Green onion (*Allium*

fistulosum L.) is an important ingredient of american cuisine. It has different nutrients such as carbohydrates, proteins, lipids, minerals (magnesium, calcium, potassium and iron), vitamins (A, C, E, K) and a lot of fiber that facilitate digestion and avoid different problems like colon diseases and constipation (Sakakibara, et al., 2003). Onion is used as a test material to detect genotoxic effects of different chemicals (Datta, et al., 2018), for that reason in this article, electrochemical quantification of chlorpyrifos in white and green onions was investigated.

Experimental

Reagents and apparatus. Lorsban® pesticide was acquired in agrochemical business house of Tunja city (Colombia) the active ingredient (AOAC, 1990) was obtained through liquid-liquid extraction proposed by Leoni et al. (1992). All solutions were prepared with water purified in a Milli-Q system from Millipore Corporation. Prior to all measurements, solutions were deaerated by passing N₂ gas (SS White Martins) for approximately 15 min.

The electroanalytical equipment was a computer controlled BAS CV 50W electrochemical analyzer from Bioanalytical Systems, Inc. (West Lafayette, IN) with three-electrode cell with Ag/AgCl reference electrode, a platinum wire as auxiliary electrode and a drop mercury electrode as working electrode.

Preparation of standard and work stock solutions. Britton Robinson electrolyte solution at pH 13 was employed. CP Stock solution of 1000 ppm was prepared in ethanol. Intermediate solution of 100 ppm was prepared from stock solution. Standard solutions were 0.0, 0.4, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 and 20.0 ppm. The concentrations selection was made based on maximum allowable concentrations for the active compound permitted by FAO (1986). All standard and work solutions were stored at 4°C before use.

Sample Analysis. Green onion (*Allium fistulosum* L) and white onion (*Allium cepa* L) representative samples (5 kg) were collected at random according to an experimental design that covered the entire onion market within the city of Tunja, from Aquitaine and Samacá, respectively, on peak market days: Tuesdays and Fridays, during two seasons with broad seasonal variations under optimal health and commercial maturity stage (intermediate maturity). 3 mL of standard solution, 1 mL of onion extract and 3 mL of the electrolyte solution were mixed and adjusted to pH 13. Then, this mixture was transferred to the polarographic cell, the computer was programmed according to the previous optimization parameters, and measurements were conducted.

Validation method. It took the following main steps: cleaning electrode system, extraction of active principles, selection of instrumental conditions: initial potential, ultimate potential, deoxygenation of the sample, size of the mercury drop, quiet time, sensitivity, scan speed, and potential range. The following were used for the method validation: detection limit (DL), quantitation limit (QL), precision, accuracy, range of use, sensitivity and uncertainty. Recovery (%) was calculated by equation 1 (Wani, et al. 2019).

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{Residue in ppm}}{\text{Fortification level}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Chlorpyrifos results in white and green onions by Linear Sweep Polarography were compared with those obtained in conventionally accepted techniques: GC/ECD, performed in a gas chromatograph (GC) HP PLUS Series 6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA), equipped with an electron capture detector (ECD). The column used in analysis was DB-5 [5%-phenyl-poly (metilililoxane), 30m x 0.25 mm x 0.25 μm]. The injection was performed in splitless mode (Viny = 1 μL). Data processing was performed with SPSS 2012.

Results and discussion

Verifying potential mercury resistance and the auxiliary electrode (platinum). Mercury resistance ($0.30 \pm 0.11 \Omega$) was measured by a multimeter Univolt DT-888 model. The optimal value should be 0.00Ω . We proceeded by cleaning the electrolysis, obtaining a value of $0.110 \pm 0.048 \Omega$. The measured potential of the auxiliary electrode was $6.02 \pm 0.11 \text{ V}$. This value indicates that the platinum electrode was within the tolerable potential range: $0\text{--}20\Omega$, being suitable for use in the polarographic technique.

Response Equipment for CP signal. With the aim of discovering whether the selected target (ethanol) interfered with the analysis technique for CP exploratory sweep was conducted by selecting a range of -1000 to -2200 mV , generating a signal at a potential of -1905 mV . The presence of this signal is confirmed by choosing a shorter potential range. To avoid this interference a potential range of -600 to -1500 mV was chosen which showed no signal. With the selected potential range, (-600 to -1500 mV) ran a standard of CP for the potential of electroactivity, the analyte had two signals (-720 and -940 mV). The final range of working potential was -600 to -1100 mV (Figure 1), which allowed further improvement of the economy and speed of the analysis.

Redox potential. Cyclic voltammetry (CV) method can identify accurately the redox

potential of electrochemical species that provide information about whether or not the species evaluated is reversible. The CP has a reversible reduction reaction, i.e. CP for this measurement technique is first reduced (-825 mV and 671 mV) and then oxidized (-716 and 867 mV). This is evidence that it presents intensity analyte: one negative (reduction) and the other with a positive sign (oxidation) (Figure 2).

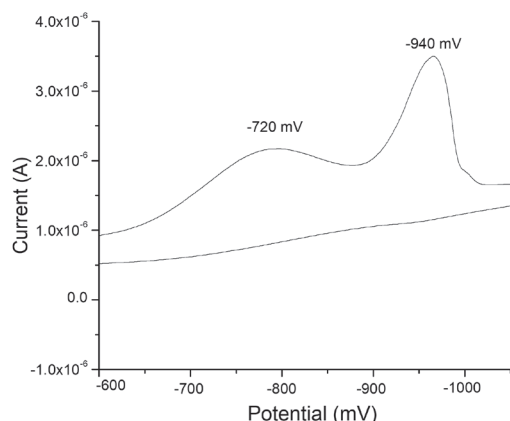


Figure 1. Sweep polarograms of chlorpyrifos. Standard of CP for the potential of electroactivity, the analyte had two signals: -720 and -940 mV . The second polarogram corresponds to blank.

Selecting the working pH. The optimum working pH selection was assessed in order to observe the relationship pH versus the current electroactive species analyzed (Liu, et al. 2001). Examined the relationship of pH vs. hydrolysis of chlorpyrifos, concluding that the greatest degree of hydrolysis was in a basic pH. Manisankar and others (2005) conducted a five OPP quantification using electrochemical technique by square wave voltammetry and determined that pH 13 show the greatest reduction of chlorpyrifos.

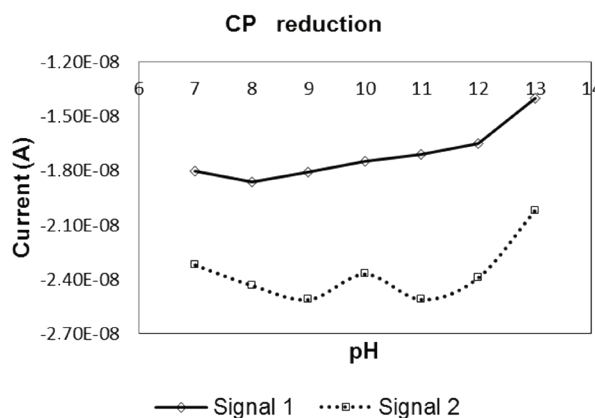


Figure 2. CP reduction behavior.

The CP in the reduction process generates two species and each generates a respective signal. The first signal occurs at -637.3 ± 32.3 mV and the second -795.6 ± 28.1 mV. The current carrying capacity of both species occurs at pH 13. The direction of the applied potential is negative-positive, indicating that the reaction is carried out cathodic i.e. electroactive species undergo a reduction process.

Parameters of the polarographic measure.

Ethanol was selected as the solvent for CP and it was used as a supporting electrolyte in a Britton-Robinson (BR) buffer to pH 13. Consecutive tests were developed which were modified and optimized using the following device parameters: deoxygenation of the sample: 5 minutes, working potential range: -600 to -1100 mV, initial potential: -600 mV, final potential 1100 mV, sensitivity: 1 uS, mercury drop size: 8, quiet time: 5 seconds and scan speed and sampling interval: 10 mV/s.

CP reduction. Hydrolysis is an important way to eliminate OPP. Generally, this process involves the breaking of one of the phosphoric acid esters or thiophosphoric acid and it is strongly dependent on pH and other constituents of the solution. The hydrolysis can be initiated via a nucleophilic or electrophilic attack (Smolen, and Stone, 1995).

CP has three ester linkages that are candidates for the start hydrolytic, two ester bonds and tertiary alkyl phosphate ester bond (pyridyl). Smith et al. (1967.) found two possible mechanisms of PO hydrolysis: neutral and alkaline hydrolysis. Neutral hydrolysis of chlorpyrifos and other organophosphate esters involve nucleophilic water attacks in less saturated carbon (weak center) with the loss of the alkyl groups. Alkaline hydrolysis and other organophosphorus esters are initiated by a nucleophilic attack of the hydroxyl ion to the phosphorus atom (strong core) causing a loss of acid group output alcoholic or phenolic group. The catalysis of the alkaline hydrolysis is assumed to be due to second order kinetics (SN2) (Macalady and Wolfe, 1983; Smith, Watson, and Fischer et al, 1967).

Calibration curve. Graphed current generated (or response signal in Amps) versus concentration (ppm) obtaining the linearity range (Figure 3). CP polarographic presents two signals, the first signal defines better the polarographic wave, which has a lower standard deviation, which is determined for purposes of quantification of chlorpyrifos in natural samples and was made based on the first signal generated by the analyte.

Validation of the method for CP quantification

Method attributes. Attributes CP quantification method by linear sweep Polarography obtained are summarized was applied in Table 1. The validated method in onion extracts.

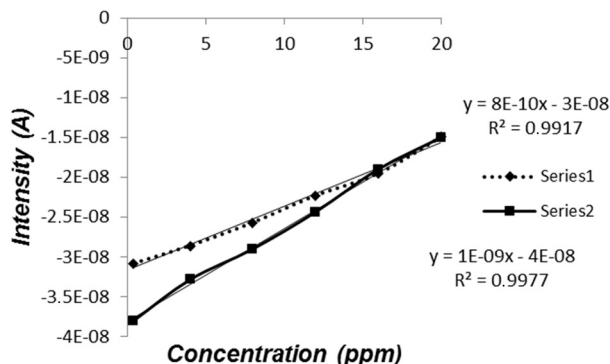


Figure 3. CP Linearity Range ($\text{mg} \times \text{L}^{-1}$).

Reproducibility of the method was evaluated in Welsh onion extracts, evaluating the current operation under standardized conditions with CP patterns. In total four trials were performed in one day, each with 6 replicates and two analysts, for a total of 48 trials, using the same equipment and the same basis for preparing extracts of the standards. The white onion does not generate any signal that might cause interference with the polarographic method and require adjustments. The readings were made with a completely randomized design.

Table 1. Attributes CPF validation method.

Attributes	Value
Confidence level	90.000%
Detection Limit	0.207 ppm
Quantification limit	1.268 ppm
Sensitivity	3.000×10^{-8} A/ppm
Accuracy in a high range	107.910%
Accuracy in a low range	91.517%
Precision	$\pm 5.321 \times 10^{-10}$ A
Recovery (%)	112.290 %
Total uncertainty	± 0.062 ppm

The variance analysis concerning reproducibility determined that the current intensities and sample standard natural + 6 standard tests performed by the two analysts in the validation process did not vary significantly, the calculated F value was less than the F acceptance criteria. It was determined that the analytical method has a 90% confidence level.

Quantitative determination of CP in green and white onion

The validated method was applied to green and white onion extracts. The polarograms showed no signal. Solutions were made from the sample and every team assessed the response, choosing the solution 1:3 V: V (sample: ethanol). Later volumes were optimized sample and standard solution CP (3 ppm). The best response was obtained by adding to the cell 3mL of the polarographic standard, 3 mL of the electrolyte solution and 1 mL of the native sample (Figure 4).

CP concentration in the sample was calculated according to Equation 1 given by the AOAC 970.53 method (AOAC, 1990). CP content was 0.300 ± 0.062 ppm in white onion and 0.840 ± 0.062 ppm in green onion. CP levels from Aquitaine and Samacá towns exceed the limits of Acceptable Daily Intake (ADI) suggested by the NTC CIPAC MT 36 and 29 and FAO which sets the maximum intake level at 0-0.01 mg/kg body weight, and the MRL of 0.2 mg/kg (FAO/WHO, 1986). Given that the onion is a very consumed food and pollution control reports are not conducted by governmental entities, the values can be inferred that there is an imminent risk of contamination with chlorpyrifos, as and possibly other agricultural products with greatest danger to the child population in whom the baby food MRL is 10 times smaller than the accepted in adult (Lu, Knutson, Fisker-Andersen,

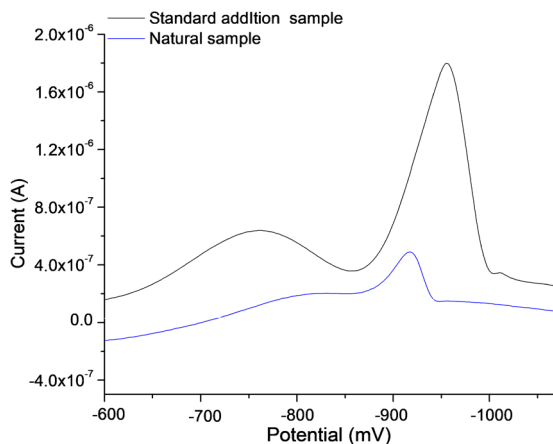


Figure 4. Polarograms natural sample and standard addition sample.

and Fenske, 2001; Holland, 1996). The strong tendency to use POFs, ranked toxicological categories I and II (CP) in cultural practices of food products are generating residual dangers as cholinesterase inhibitors, responsible for catalyzing the hydrolysis of acetylcholine to choline and acetic acid. Monitoring pesticide residues in food is important to determine the degree of population exposure and prevent possible long-term toxicological consequences and changes in cultural practices.

Comparison of results

Linear Sweep Polarography versus reference method GC/ECD. Reliability checks polarographic measurement reading a standard 2 ppm and two extracts from the array of work, compared to the results of the reference method GC/ECD. Table 2 shows the concentrations determined by GC/ECD CP in the samples. The values reported by the laboratory chromatography of CP quantifying submitted samples was performed to correct the concentration due to dilution and the amount of biological material used. We can observe that certain concentrations of CP in the three samples of polarography scan are superior to the reference method. This difference was assessed by analysis of variance, which references the standard concentration of 2 ppm. The analysis indicated that it did not show significant difference in the concentration of CP standard determined by the two analysis techniques. The calculated 'F' value was less than the critical F acceptance. The analysis was performed with a confidence level of 90%, corresponding to the polarographic method.

Table 2. CP concentrations in samples determined by linear sweep polarography and GC / ECD

Sample	Concentration (ppm)	
	Linescan polarography (Confidence level 90%)	CG/ECD (Confidence level 95%)
Green onion: MNCI-1	0.840	0.383
White onion: MNCC-1	0.300	0.118
Standard 2 ppm: SBPC-1	1.600	1.270

Conclusion

The analytical method of Linear Sweep Polarography for the quantification of the organophosphate pesticide chlorpyrifos in green and white onions is valid and reliable. This method was compared to GC/ECD as a reference method. The CP standard concentration determined by

both analytical techniques showed no significant difference. The analysis was performed with a confidence level of 90%, corresponding to the polarographic method. The residual concentration of CP in green onion and white onion sold in the city of Tunja exceeds by 420% and 150% respectively the maximum permitted levels of ADI (0.01 mg/kg body weight) and RML (0.2 mg/kg) established by current regulations CIPAC MT 36, NTC 29, and *Codex Alimentarius* (FAO/WHO). The methodology developed may be used in other agricultural products for quantification of POP. The Analytical Laboratory of the Environmental Chemistry research group (GIQUA) has the necessary conditions to assess CP content matrices of agricultural origin, with an uncertainty of ± 0.062 ppm.

References

- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. Edited by Kenneth Helrich, 15th edition. 1990, p. 289. https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/
- Bauer, A.; Kuballa, J.; Rohn, S.; Jantzen, E. and Luetjohann, J. 2018. Evaluation and validation of an ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry pesticide screening approach. *J Sep Sci*, 41, 2178–2187. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701059>.
- Centner, T. 2018. Cancelling pesticide registrations and revoking tolerances: The case of Chlorpyrifos. *Environ Toxicol Phar*, 57:53-61. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.11.009>
- Chang, F.; Zeng, L.; Zhang, Y.; Liao, X.; Ge, Y.; Hu, X. and Jiang, L. 2009. Degradation behaviour of methamidophos and chlorpyrifos in apple juice treated with pulsed electric fields. *Food Chem.*, 112(4):956-961. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.016>
- Chen, D.; Liu, Z.; Fu, J.; Guo, Y.; Sun, X.; Yang, Q. and Wang, X. 2017. Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes/dicyclohexyl phthalate modified screen-printed electrode for detection of chlorpyrifos. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 801 (2017) 185–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.032>
- EPA. 1996. *Environmental Protection Agency. Compilation of EPA's Sampling and Analysis*. Edited by Lawrence H. Keith, CRC Lewis Publishers (CRC Press Inc.), Boca-Raton, 2nd Edition., 920-921 and 1451-1452.
- Datta, S.; Singh, J.; Singh, J.; Singh, S. and Singh, S. 2018. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sus. Env. Res*, 28(4), 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.005>.
- Del Puerto, A.; Suárez, S. and Palacio, D. 2014. Effects of pesticides on health and the environment. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 52(3): 372-387. <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig10314.pdf>.
- FAO, 2016. *FAOSTAT*. UN Food and Agriculture Organization, Rome. Retrieved from: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- FAO/WHO. 1986. *Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Guide to Codex Recommendations concerning pesticide residues*. Part 2: Maximum limits for pesticide residues. Rome. Retrieved from: <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-e.htm>
- Holland, P. 1996. Glossary of terms related to pesticides. *Pur. App. Chem.*, 68, 1167-1193. <https://doi.org/10.1351/pac200678112075>
- Leoni, V.; Caricchia, A.; Chiavarini, C. 1992. Multiresidue method for quantitation of organophosphorous pesticides in vegetable and animal foods. *J. AOAC Int.* 75: 511-518.
- Li, D.; Huang, Q.; Lu, M.; Zhang, L.; Yang, Z.; Zong, M. and Tao, L. 2015. The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* 135, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.024>
- Li, X.T.; Zhu, D.Z.; Ma, Z.H.; Pan, L.G.; Wang, D. and Wang, J.H. 2012. Feasibility study of the detection of chlorpyrifos residuals on apple skin based on infrared micro-imaging. *Opt. Eng.* 51 (10): 103204. <https://doi.org/10.1117/1.OE.51.10.103204>
- Liu, B.; McConnell, L.L. and Torrents, A. 2001. Hydrolysis of chlorpyrifos in waters of the Chesapeake Bay. *Chemosphere*, 44 (6):1315-1323. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00506-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00506-3)
- Lu, C.; Knutson, D. E.; Fisker-Andersen, J. and Fenske Richard A. 2001. Biological Monitoring Survey of Organophosphorus Pesticide. Exposure among Preschool Children in the Seattle Metropolitan Area. *Environ. Health Perspect.*, 109(3): 299-303. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109299>
- Macalady, D.L and Wolfe, N.L. 1983. New perspectives on the degradation of the organophosphorothioate insecticide chlorpyrifos. *J. of Agric. and Food Chem.*, 18, 1139-1147. <https://doi.org/10.1021/jf00120a003>
- Manisankar, P.; Viswanathan, S.; Mercy, A. and Rani C. 2005. Electrochemical studies and square wave stripping voltammetry of five common pesticides on poly 3,4-ethylenedioxythiophene modified wall-jet electrode. *Anal. Chem. Acta.* 528, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.027>
- Moghbeli, T.; Bolandnazar, S.; Panahande, J. and Raei, Y. 2019. Evaluation of yield and its components on onion and fenugreek intercropping ratios in different planting densities. *J. Clean Prod.* 213, 634-641. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.138>
- Otieno, P.O.; Owuor, P.O.; Lalah J.O.; Pfister G. and Schrammb K.W. 2013. Comparative evaluation of ELISA kit and HPLC DAD for the determination of chlorpyrifos ethyl residues in water and sediments. *Talanta*, 117: 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.014>.
- Pope, C.; Karanth, S. and Liu, J. 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action.

- Environ Toxicol Pharmacol*, 19(3):433–446. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.048>
- Rai, S.; Singh, A.K.; Srivastava, A.; Yadav, S.; Siddiqui, M.H. and Mudiam, M.K. 2016. Comparative evaluation of QuEChERS method coupled to DLLME extraction for the analysis of multiresidue pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry, *Food Anal. Method.* 9: 2656–2669. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0445-2>
- Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H. and Kanazawa, K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agr. Food Chem*, 51(3), 571–581. <https://doi.org/10.1021/jf0209261>
- Silver, M.K.; Shao, J.; Zhu, J.; Chen, M.; Xia, Y.; Kaciroti, N.; Lozoff, B. and Meeker, J. 2017. Prenatal naled and chlorpyrifos exposure is associated with deficits in infant motor function in a cohort of Chinese infants. *Environ. Int.* 106, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.015>
- Smolen, J. M. and Stone, A. T. 1995. Assessing The role of metal species in the hydrolysis of commonly used organophosphorus ester pesticides. 209th American Chemical Society National Meeting, Anaheim, California, USA, April 2-6. <https://doi.org/10.1021/cen-v073n005.p041>
- Smith, G.N.; Watson, B.S. and Fischer, F.S. 1967. Investigations on Dursban insecticide. Metabolism of [³⁶Cl] O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothiate in rats. *Agric. Food Chem.*, 15, 132-138. <https://doi.org/10.1021/jf60149a017>
- Wani, A.; Dar, A.; Jan, I.; Sofi, K.; Sofi, J. and Dar, I. 2019. Dissipation, risk assessment, half-life period and method validation of carbendazim and triazophos in green pea by high performance liquid chromatography. *Sep Sci plus*;1–7. <https://doi.org/10.1002/sscp.201800143>

Incidencia de las condiciones de clima en el desarrollo y producción de semillas de *Salvia hispanica* L.

Weather conditions incidence on development and production of *Salvia hispanica* L. seeds

Héctor Abel Busilacchi^{1*}, Carolina Noelia Coronel¹; Mirian Susana Bueno¹, Mirian del Pilar Gonzalez¹, Diego Raúl Müller¹, Mirta Quiroga² y Cecilia Rosa Severin³

1. Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Agrarias. Zavalla, Santa Fe, Argentina. Cátedras de Biología y Fitopatología. Universidad Nacional de Salta. 2. Facultad de Ciencias Naturales. Av. Bolivia 5150 (CP 4400), Salta, Argentina. Botánica Sistemática y Cálculo. 3. Asesor externo. *Autor para correspondencia: hbusilacchi@gmail.com

Rec.: 2017-11-08 Acep.: 2019-07-03

Resumen

El objetivo de este trabajo fue analizar la incidencia de las condiciones climáticas sobre el cultivo de *Salvia hispanica* L., conocida comercialmente como Chía, durante las campañas 2014 y 2015, para la zona núcleo de la pampa húmeda, centro-sur de Santa Fe (Argentina). La siembra se hizo en una parcela de 2 ha en el Campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), en la localidad de Zavalla (Santa Fe). Se emplearon semillas provenientes de lotes comerciales cultivados en la provincia de Salta y las evaluaciones durante ambas campañas fueron: altura de plantas, número de espigas por planta, peso de 1000 semillas y poder germinativo de las semillas cosechadas. Se observó que las heladas ocurridas no afectaron el desarrollo del cultivo. Como consecuencia de las abundantes precipitaciones y de las menores temperaturas registradas en la campaña 2014 con respecto a las de 2015, en la primera ocurrió una fuerte incidencia del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, que provocó que el número de espigas por planta (16) y el peso de 1000 semillas (0.904 g) fueran inferiores a las obtenidas en 2015 (78 espigas/planta y 1297 g el peso de 1000 semillas), junto a la aparición de semillas vanas y a un descenso del poder germinativo. Las condiciones de clima presentes durante el ciclo de cultivo de *S. hispanica* en la pampa húmeda tienen una incidencia directa en el desarrollo de la planta y en la producción y calidad de los frutos cosechados.

Palabras clave: chía, precipitaciones, temperatura, cultivo a campo, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Abstract

The aim of the research was to analyze environmental conditions incidence on *Salvia hispanica* L. during 2014 and 2015 crop years at the Humid Pampa core zone. Sowing was made in a 2 ha plot of the Experimental Camp at the Faculty of Agricultural Sciences (FCA) of the Nacional University of Rosario (UNR), placed in Zavalla, Santa Fe, Argentina. Seeds used came from commercial crops grown in the province of Salta, Argentina. Parameters evaluated in both 2014 and 2015 crop years were: plant height, number of spikes per plant, weight of 1000 seeds and germinative power. Crop development was not affected by frost. During 2014 crop year, the great amount of rain and low temperatures allowed a higher incidence of *Sclerotinia sclerotiorum*. These conditions caused a lower number of spikes per plant (15,9) and weight of 1000 seeds (0,904 g) than 2015 crop year (77,8 spikes/plant and 1,297 g weight of 1000 seeds). In 2014 crop year, empty seeds and a lower germinative power seeds was observed. Climatic conditions during *S. hispanica* culture cycle in the Humid Pampa's zone directly affected the crop development and also quality and production of harvested fruits.

Key words: Chia, environment, field crop, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Introducción

Salvia hispanica L. (familia *Lamiaceae*) es una especie comúnmente conocida como 'chía', palabra que es una adaptación española al término nahua 'chían' o 'chien' (plural), término que en náhuatl significa 'semilla de la que se obtiene aceite' y que fue usada por esta etnia como ofrenda a los dioses. El significado del nombre del actual estado de Chiapas al sur de Méjico, quiere decir 'río de chía' o 'agua de chía'. Existen evidencias que demuestran que la misma fue utilizada como alimento incluso hacia el año 3500 a. C. por las civilizaciones teotihuacanas y toltecas y posteriormente, por los aztecas y mayas, entre otras culturas mesoamericanas.

En la época precolombina fue uno de los principales alimentos de numerosas civilizaciones de América Central (Ayerza, 2016). En los últimos años las semillas de chía han incrementado notoriamente su importancia para la salud humana y la nutrición por su alto contenido en ácido graso omega-3 (aprox. 60%), siendo el más alto conocido de fuentes vegetales. La chía tiene un alto contenido de proteína y fibra dietética, además de ser una excelente fuente de calcio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc y cobre, con una concentración tres veces más alta que los productos tradicionales, como la espinaca, las legumbres y la leche, siendo una alternativa ideal en la elaboración de alimentos (García Salcedo et al., 2018).

Los estudios médicos y epidemiológicos han demostrado que los ácidos grasos omega-3 son nutrientes esenciales y desempeñan un importante papel en la salud humana principalmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares, siendo antitrombóticos, antiinflamatorios, y antiarrítmicos (Bochicchio et al., 2015).

La producción, consumo y demanda de *S. hispanica* ha aumentado en los últimos años. Es una planta herbácea o arbustiva anual, con una altura entre 1 y 2 m. Los frutos se presentan en grupos de cuatro clusas. Estas son monospermas, ovals y tienen 1.5 - 2 mm de longitud y 1 - 1.2 mm de diámetro, promedio, son suaves y brillantes, de color pardo grisáceo con manchas irregulares castaño oscuro en su mayoría y en menor proporción blanquecinas (Di Sapio et al., 2012). Es una especie sensible al fotoperíodo, que produce yemas florales en días cortos (Jamboonsri et al., 2012), su crecimiento varía de acuerdo con la latitud y el ciclo de cultivo puede variar entre 90 y 150 días.

Actualmente la chía se cultiva comercialmente en Australia, Bolivia, Colombia, Guatemala, México, Perú y Paraguay. En las regiones del oeste Paranaense y noroeste de Río Grande do

Sul en Brasil los agricultores comenzaron a invertir con buenos resultados en el cultivo de chía (Jamboonsri et al., 2012, Busilacchi et al., 2015). En Argentina se cultiva principalmente en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán (Busilacchi et al., 2015). En este país se han realizado estudios sobre la calidad de las semillas y las harinas de chía son comercializadas en herboristerías y tiendas dietéticas de la ciudad de Rosario, Santa Fe, (Severin et al., 2010; Bueno et al., 2010; Périgo et al., 2011); también se han llevado adelante con gran éxito las primeras experiencias a campo con esta especie en la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), en el sur de la provincia de Santa Fe (Busilacchi et al., 2013).

En estudios realizados por Busilacchi et al. (2013) se encontró que es factible incorporar nuevas áreas de producción en Argentina, cultivando *S. hispanica* en localidades más meridionales que aquellas donde tradicionalmente se ha sembrado, como es el caso de Chabás (sur de la provincia de Santa Fe), siendo la siembra temprana durante primera quincena de enero la más adecuada para esta especie en el área de producción estudiada.

Teniendo en cuenta los buenos precios de mercado, su importancia como producto dietario-medicinal, junto a una creciente demanda internacional de chía, los productores demandan actualmente nuevas alternativas para diversificar su producción. Surge, entonces, la necesidad de evaluar y consolidar las técnicas de cultivo de esta especie en distintas regiones del país.

Por consiguiente, es importante evaluar las condiciones medioambientales de crecimiento del cultivo, las cuales pueden afectar la formación y la relación entre los principales componentes de las semillas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la incidencia de las condiciones de clima sobre el desarrollo y la producción de semillas del cultivo de *S. hispanica*, durante las campañas 2014 y 2015, para la zona núcleo de la pampa húmeda, particularmente en la localidad de Zavalla (Santa Fe, Argentina).

Materiales y métodos

La siembra de *S. hispanica* se efectuó en condiciones de secano en un suelo Argiudol vértico serie Roldán, en una parcela de 2 ha del campo experimental José F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), ubicado en la localidad de Zavalla (Santa Fe), Argentina.

En la Tabla 1 se presentan la localización y las condiciones de clima de la localidad donde se realizó el ensayo y en la Tabla 2 aparecen los registros de clima mensuales durante en período

enero - julio de las campañas evaluadas (2014 y 2015). La primera helada agrometeorológica en cada campaña se produjo el 5 de junio de 2014 (2.9 °C) y el 7 de mayo de 2015 (2.5 °C). Se entiende por helada agrometeorológica cuando la temperatura mínima registrada en abrigo meteorológico es menor que 3.1 °C y por helada meteorológica, cuando la temperatura mínima registrada en abrigo meteorológico es menor que 0.1 °C (CIAg, 2013).

Tabla 1. Localización geográfica y datos de clima del campo donde se realizó el ensayo. Campo experimental José F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina.

Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m.)	Precipitación (mm/año)	Temp. promedio (°C)
Zavalla	33° 14'	61° 21'	85	694.55 (2014)	17.3 (2014)
Zavalla	33° 14'	61° 21'	85	510.10 (2015)	18.3 (2015)

Precipitaciones totales y temperaturas promedio durante el ciclo del cultivo.
Fuente: Estación Meteorológica Campo Experimental José F. Villarino.

Tabla 2. Precipitación y temperatura mensuales durante los ciclos de cultivo 2014 y 2015. Campo experimental José F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina.

Mes	Precipitación (mm)		Temp. promedio (°C)	
	2014	2015	2014	2015
Enero	122.55	99.6	25.8	23.2
Febrero	265.6	49.7	22.1	22.2
Marzo	150.1	126.3	18.8	21.3
Abril	77.6	41.8	17.7	20.3
Mayo	29.3	124.6	14.1	16.3
Junio	17.0	20.6	10.8	13.0
Julio	32.4	47.5	11.9	11.4

Precipitaciones totales y temperaturas mensuales promedio durante el ciclo del cultivo.

Fuente: Estación Meteorológica Campo Experimental José F. Villarino.

Para la siembra se emplearon semillas de chíca descendientes de la variedad Criolla de Acatic, Jalisco, provenientes de lotes comerciales cultivados en la provincia de Salta. Antes de la siembra, se hizo un control de malezas y se roturó el suelo con arado de disco. Se utilizó una sembradora de grano fino en surcos distanciados 17.5 cm y la siembra se hizo en la segunda quincena de enero, tanto para la campaña 2014 como para la de 2015, a una densidad de 3.5 kg/ha. Durante los 60 días iniciales de cultivo y hasta que las plantas cubrieron el entresurco, el control de malezas se realizó en forma manual. No se identificaron plagas limitantes para el cultivo, por tanto no se hicieron aplicaciones de plaguicidas.

Para las evaluaciones, en ambas campañas se cosecharon al azar y en forma manual 10 plantas

completas en una superficie efectiva de muestreo de 1,5 has (descontando las borduras y caminos adyacentes, en la segunda quincena de junio. Se consideró como momento adecuado para cosecha cuando las plantas presentaron 80% de las hojas con coloración oscura, secas o muertas (Miranda, 2012). Se midieron la altura de planta (m), número de espigas por planta y peso de 1000 semillas (g). Además se determinó el porcentaje de germinación de las semillas cosechadas en ambas campañas. Debido a la falta de protocolos para semillas de *S. hispanica* en los manuales de tecnología de semillas, se utilizaron como referencias básicas las recomendaciones para algunos géneros de la familia Lamiaceae (ISTA 2003).

La prueba de germinación de semillas se realizó en cajas Petri sobre algodón y papel filtro húmedo, en cuatro repeticiones con 25 semillas cada una. El material fue incubado durante 21 días en cámara de crecimiento a 23 ± 2 °C.

Para la identificación de patógenos se realizaron aislamientos a partir de trozos de tallos de plantas de chíca infectados en campo. Estos fueron propagados en agar-papa-glucosado (APG) al 2% en cajas Petri. Los trozos de tallo de aproximadamente 0.5 cm fueron desinfectados previamente con hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min y posteriormente lavados con agua estéril. Las cajas con los explantes se colocaron en estufa a 25 °C con alternancia de luz/oscuridad de 16h/8h durante 7 días. Las colonias resultantes fueron identificadas por su morfología bajo lupa binocular con aumentos de 10x y 40x (Forty de Amerikan Optikal) y microscopio óptico Leitz con aumentos entre 10x y 40x, utilizando la clave de Barnett (1998).

El diseño experimental en campo fue en bloques al azar. Los resultados se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2016) y la normalidad de los datos se comprobó mediante el Test Shapiro-Wilk. Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar diferencias entre las medias de los tratamientos.

Resultados

Durante enero y febrero de 2015 la precipitación fue inferior a la de la misma época de 2014 (ver Tabla 2). En la Figura 1 se observa que la altura de planta fue de 1.592 m para la campaña de 2014 y de 1.347 m para 2015 ($P < 0.05$).

Tanto las heladas meteorológicas (2.9 °C) como las agrometeorológicas (2.5 °C) no afectaron el desarrollo del cultivo, ya que las primeras se registraron al comienzo de junio de 2014 y las

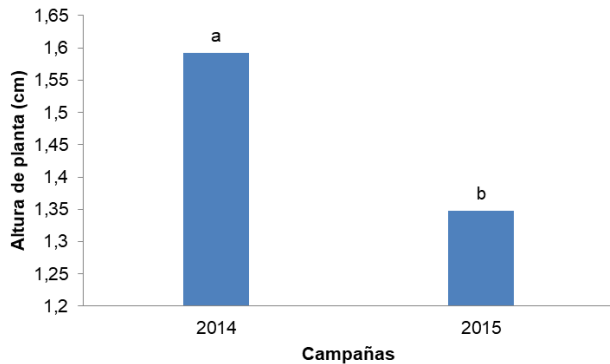


Figura 1. Altura de plantas de *S. hispanica* L. en las campañas 2014 y 2015, Campo Experimental José F. Villarino, Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina.

Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ≤ 0.05

segundas en mayo de 2014, antes de la cosecha. La floración para ambas campañas se produjo a mediados de abril y la duración del ciclo del cultivo fue de 150 días, aproximadamente.

En la campaña 2014 se observaron algunas plantas con tallos afectados por pudrición seca y esclerocios en la corteza (Figura 2), igualmente la presencia de inflorescencias aisladas que presentaron coloración castaño claro en contraste con el resto que presentaba una coloración verde típica de la etapa fenológica de floración. En diferentes sectores de los lotes y en especial en grupos de plantas de mayor altura y abundante follaje se observó desprendimiento de frutos cuajados en el estado de madurez fisiológica.

Yeboha et al. (2014) identificaron diferentes patógenos infectando el cultivo de chía, entre ellos, *Fusarium solani*, *F. pallidoroseum* y *Cladosporium* spp., que producen marchitamiento y secado de hojas. Celli et al. (2014) identificaron los virus: Sida mosaico Bolivia virus 2 y Tomato yellow spot



Figura 2. Tallo de *S. hispanica* L. con pudrición seca y esclerocios en superficie, campaña 2014. Campo Experimental José F. Villarino, Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina.

virus en plantas provenientes de Salta (Argentina) que mostraban deformaciones en hojas, clorosis y enanismo. En cultivos de Famaillá (Tucumán, Argentina) se encontraron plantas muertas con síntomas de pudrición seca y presencia de esclerocios grandes, también identificaron algunas inflorescencias de coloración castaño claro y presencia de una mancha blanca por *S. sclerotiorum* (Aguaysol et al., 2014). Este patógeno es muy polífago, afecta más de 64 familias de plantas y las temperaturas óptimas para su desarrollo varían entre 12 y 18 °C. La humedad relativa que favorece el inicio de la infección es de 90% o mayor y coincide con lluvias o neblina abundantes).

La pudrición húmeda detectada tanto en Salta como en Tucumán es una enfermedad que debe ser tenida en cuenta al momento de planificar la producción de chía, debido a que puede llegar a causar severas pérdidas cuando no se maneja en forma adecuada. Es importante tener en cuenta que el hongo se propaga con la semilla infectada y una vez que se establece en el lote de cultivo, es muy difícil de manejar por la sobrevivencia del patógeno en el suelo (Aguaysol et al., 2014). Hasta la fecha, en la zona núcleo de Santa Fe, Argentina, no existe información sobre la incidencia de *S. sclerotiorum* para el cultivo y producción de *S. hispanica*.

En la cosecha se encontraron esclerocios acompañando los granos de chía (Figura 3), lo que indica la presencia de *S. sclerotiorum* (Figura 4).

Las condiciones ambientales de 2014 fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad y se caracterizaron por bajas temperaturas en la etapa de floración y llenado de grano, y mayores precipitaciones que en 2015 (ver Tabla 2).



Figura 3. Semillas de *S. hispanica* con esclerocios de *S. sclerotiorum*, cosecha 2014. Campo Experimental José F. Villarino, Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina.

El número de espigas/planta: 15.9 en la cosecha 2014 y 77.8 en 2015 (Figura 5), y el peso de 1000 semillas: 0.904 g en 2014 y 1.297 g en 2015 (Figura 6) fueron diferentes ($P < 0.01$) entre ambas campañas. No obstante la mayor altura de planta en la campaña 2014, ésta no estuvo relacionada con la producción de semilla debido a la fuerte incidencia de *S. sclerotiorum* en la etapa de floración y llenado de grano.

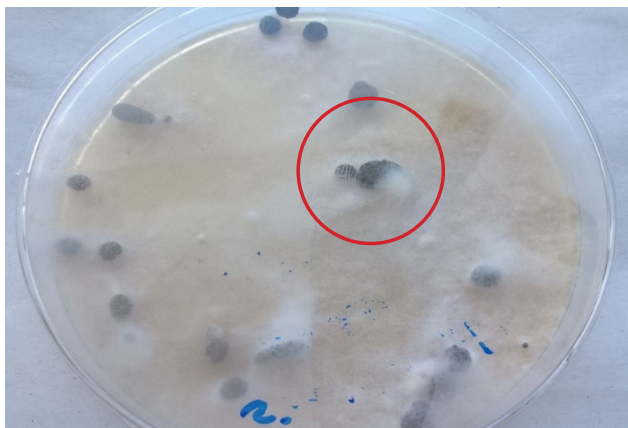


Figura 4. Cultivo puro de *S. sclerotiorum* obtenido en caja Petri donde se observa la presencia de esclerotos. Campo Experimental José F. Villarino, Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina.

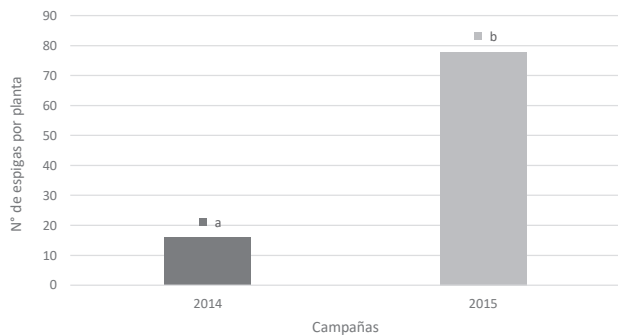


Figura 5. Número de espigas/planta de *S. hispanica* L. en las campañas 2014 y 2015. Campo Experimental José F. Villarino, Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina. Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ≤ 0.05 .

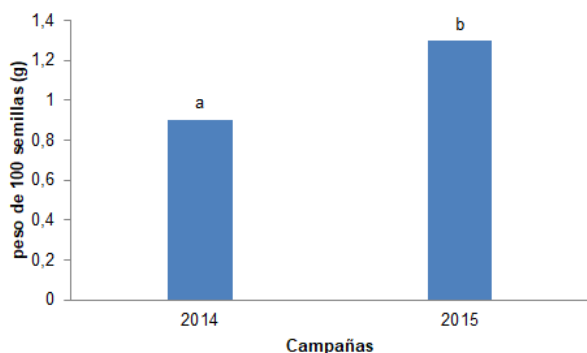


Figura 6. Peso de 1000 semillas de *S. hispanica* L. en las campañas 2014 y 2015. Campo Experimental José F. Villarino, Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), Zavalla (Santa Fe), Argentina. Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ≤ 0.05 .

El peso de 1000 semillas fue afectado por la presencia de semillas vanas como consecuencia del ataque de *S. sclerotiorum* durante la campaña 2014.

La germinación de las semillas fue, en promedio, de 55% en la campaña 2014 y de 95% en 2015. El bajo poder germinativo de las semillas en la campaña 2014 estuvo acompañado por una elevada presencia de esclerocios durante la recolección (ver Figura 3).

Discusión

La menor altura de las plantas de chíá en 2015 fue debido a la baja precipitación, principalmente en febrero y comienzo de marzo de 2015, coincidente con la etapa de crecimiento vegetativo. Según Yeboah et al. (2014) *S. hispanica* exige un adecuado suministro de agua durante las primeras fases fenológicas, correspondientes al crecimiento vegetativo, mientras que condiciones más secas y con menores precipitaciones son necesarias durante las fases posteriores, especialmente durante la maduración de la semilla. Martínez et al. (2012) encontraron que la escasez de agua en la estación de crecimiento de chíá tiene un efecto significativo en los bajos rendimientos, tanto en cantidad como en calidad de la producción. Cuando la planta sufre escasez de agua, los frutos pueden resultar muy pequeños, con tejidos gruesos y fibrosos.

En las condiciones del presente estudio, las heladas no afectaron el cultivo de chíá ya que éstas ocurrieron después de la cosecha y solo se registraron dos heladas agrometeorológicas aisladas en junio de 2014 y mayo de 2015. Lukatkin et al. (2012) encontraron que temperaturas bajo 0 °C ocasionan importantes daños en muchas plantas tropicales, incluso en especies del género *Salvia*. Baginsky et al. (2016) consideran que las heladas retardan el desarrollo de la chíá por lo que en aquellas localidades donde éstas ocurren a partir de abril, la siembra debe ser programada para evitar la producción en esta época. El ciclo del cultivo total de la chíá en este estudio fue similar al observado por Busilacchi et al. (2013), y varió entre 144 a 170 días, para la localidad de Chabás (Santa Fe) y por Lobo et al. (2011) en Tucumán.

Las condiciones de clima durante el periodo de investigación fueron favorables para el desarrollo del hongo *S. sclerotiorum*, lo que coincide con los resultados obtenidos por Aguaysol et al. (2014), quienes detectaron quiebre y pérdida de espigas afectadas por este hongo en lotes de la localidad de Famaillá (Tucumán) para el ciclo productivo 2014. Manzaneda Delgado (2015) sugiere que la incidencia de lluvias abundantes es un factor negativo para el desarrollo de *S. hispanica*, especialmente en las fases de floración y maduración.

Como consecuencia de las abundantes precipitaciones y de las menores temperaturas registradas en la campaña 2014 en relación con 2015, se evidenció una fuerte incidencia de *S. sclerotiorum* sobre el cultivo, afectando tanto el número de espigas/planta, como el peso de 1000 semillas y generando la aparición de semillas vanas. La presencia de estas últimas también fue observada por Alzugaray et al. (2007) en semillas de *Schinopsis balansae*.

La calidad de las semillas depende de su capacidad para germinar y producir una planta normal y es determinada por una serie de condiciones genéticas de la especie y el medio en el cual se producen, cosechan, procesan y almacenan. Según Salinas et al. (2008) la siembra correcta del cultivo, la elección de prácticas de manejo adecuadas y la selección de genotipos adaptados al ambiente, determinan los óptimos rendimientos y calidad de las semillas.

En este estudio, las semillas de *S. hispanica* cosechadas en 2014 presentaron menores porcentaje de germinación que las de 2015, posiblemente por la presencia de esclerocios en las primeras. Alzugaray et al. (2007) encontraron que semillas de *S. balansae* presentaron un menor porcentaje de germinación en la cosecha 2001 con respecto a la cosecha 2000, debido a la infestación con *Alternaria* spp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp. Ayerza (2016) en cultivos de *S. hispanica* en Ecuador y Bolivia, encontró que el rendimiento, la duración del ciclo e incluso la composición de las semillas, son afectados por las características del ecosistema y las condiciones de la época de cultivo.

Conclusiones

Las condiciones de clima durante el ciclo de cultivo de *S. hispanica* en la Pampa húmeda argentina inciden significativamente en el desarrollo y en la producción y calidad de las semillas. Así, el rendimiento en la zona puede ser afectado por la escasez de precipitaciones en la primera fase de cultivo, siendo necesario mantener un nivel adecuado de agua disponible en el suelo para asegurar el crecimiento de la planta y una alta producción de semillas.

El exceso de precipitaciones y el descenso de la temperatura durante las etapas de floración y llenado de granos favorecen el desarrollo y la incidencia de *S. sclerotiorum*, afectando el número de espigas por planta y generando semillas vanas, con la consiguiente pérdida del poder germinativo.

Referencias

- Aguaysol, N.C.; Terán, L.R.; González, V.; Lobo Zavalía, R. y Ploper, L.D. 2014. Detección de *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivos de chía (*Salvia hispanica*) en Tucumán durante la campaña 2014. *Avance Agroindustrial* 35(4):20-24.
- Ayerza, R. 2016. Crop year effects on seed yields, growing cycle length, and chemical composition of chia (*Salvia hispanica* L.) growing in Ecuador and Bolivia. *Emirates J. Food and Agriculture*, 28 (3):196-200. DOI 10.9755/ejfa.2015-05-323.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J.; Salinas, A. R. y Pioli R. 2007. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schldtl. *Revista Iberoamericana de Micología* 24(2):142-147.
- Baginsky, C.; Arenas, J.; Escobar, H.; Garrido, M.; Valero, D.; Tello, D.; Pizarro, L.; Valenzuela, A.; Morales, L. y Silva, H. 2016. Growth and yield of chia (*Salvia hispanica* L.) in the Mediterranean and desert climates of Chile. *Chilean J. Agricultural Research* 76(3)255-264. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392016000300001>
- Barnett, H. L. y Barry, B. H. 1998) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. Saint Paul, Mn APS Press, 218 pp.
- Bochicchio, R.; Phillips, T.D; Lovelli, S.; Labella, R.; Galgano, F; Di Marisco, A., Perniola, M. and Amato, M. 2015. *Innovative Crop Productions for Healthy Food: The Case of Chia (Salvia hispanica L.)*. En: Vastola A. eds. *The Sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin*. Springer, Cham.
- Bueno, M.; Di Sapio, O.; Barolo, M.; Busilacchi, H. y Severin, C. 2010. Análisis de la calidad de los frutos de *Salvia hispanica* L. Lamiaceae) comercializadas en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(3):221-227.
- Busilacchi, H.; Quiroga, M.; Bueno, M.; Di Sapio, O.; Voykos, F. y Severin, C. 2013. Evaluación de *Salvia hispanica* L. Cultivada en el sur de Santa Fe (República Argentina), *Cultivos tropicales* 34(4):55-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.1234/ct.v34i4.731>.
- Busilacchi, H.; Qüesta, T. y Zuliani, S. 2015. La chía como una nueva alternativa productiva para la región pampeana, *Agromensajes* 41:37-46.
- Celli, G.; Perotto, M.; Martino, J.; Flores, C.; Conci, C. y and Rodríguez Pardina, P. 2014. Detection and Identification of the First Viruses in Chia (*Salvia hispanica*). *Viruses*, 6: 3450-3457. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/v6093450>
- Centro de Información Agroglimática. 2013. Heladas en la Argentina. <https://www.agro.uba.ar/heladas/definiciones.htm>
- Di Sapio, O.; Bueno, M.; Busilacchi, H.; Quiroga, M. y Severin, C. 2012. Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L. Lamiaceae. *Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(3):249-268.
- García-Salcedo, A.J.; Torres-Vargas, O.L. and Ariza-Calderón, H. 2018) Physical-chemical

- characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*), amaranth (*Amaranthus caudatus L.*), and chia (*Salvia hispanica L.*) flours and seeds. *Acta Agronómica* 67(2):215-222. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.63666>
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarino-Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.A; Tablada, M. y Robledo, C. W. 2008. InfoStat, version 2016, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- International Rules for seed Testing. 2003. Edition 2003/1. Zurich, Switzerland. 1 (984):7-22.
- Jamboonsri, W.; Phillips, T.D.; Geneve, R.L.; Cahill, J.P. and Hildebrand, D.F. 2012. Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica L.* - a new ω 3 source. *Genetic Resources Crop Evolution*, 59:171-178.
- Lobo, R.; Alcocer, M.; Fuentes, F.; Rodriguez, W.; M. Morandini y M. Devani. 2011. Desarrollo del cultivo de chia en Tucumán, República Argentina. *EAAOC-Avance Agroindustrial*, 32(4):27-30.
- Lukatin, A.; Brazaityté, C.; Bobinas, and Duchovskis, P. 2012. Chilling injury in chilling – sensitive plants: a review. *Zemdyrbyste Agriculture* 99:11111-124.
- Manzaneda-Delgado, F. (2015). Evaluación de la producción de dos variedades de Chía (*Salvia hispanica L.*), en dos densidades de siembra. *Apthapi* 1(1):13-18.
- Martínez, C.; Soza, F. y Garay, E. 2012. *Manual de establecimiento de cultivos*. Escuela Agrícola Panamericana, Ciencias y Producción Agropecuaria. República de Honduras.
- Miranda, F. 2012. *Guía Técnica para el Manejo del Cultivo de Chia (Salvia hispanica) en Nicaragua*. Sébaco: Central de Cooperativas de Servicios Múltiples Exportación e Importación Del Norte (Cecoopsemein RL). 14p.
- Pérego, C.; Cases, M.; Bueno, M.; Di Sapiro, O.; Busilacchi, H. y Severin, C. (2011). Caracterización de harinas de chía (*Salvia hispanica L.*) comercializadas en Rosario (Santa Fe), Argentina. *Dominguezia* 27(2):21-26.
- Salinas, A.; Gallo, C. y Rosbaco, I. 2008) Semillas de soja de calidad, un objetivo por alcanzar. *Revista Científica Agropecuaria* 12(2):85-99
- Severin, C.; Barolo, M.; Bueno, M.; Di Sapiro, O.; Busilacchi, H. y Quiroga, M. 2010. Pureza físico-botánica de semillas de chía que se comercializan en Rosario, Santa Fe. *Revista Análisis de Semillas* 3-4(12):50-52.
- Yeboah, S.; Owusu Danquah, E.; Lamptey, J.N.L.; Mochiah, M.B.; Lamptey, S.; Oteng-Darko, P.; Adama, I.; Appiah-Kubi, Z. and Agyeman, K. 2014. Influence of planting methods and density on performance of Chia (*Salvia hispanica*) and its suitability as an oilseed plant. *Agricultural Science* 2(4):14-26. <https://doi.org/10.12735/as.v2i4p14>



Acta Agronómica



Revista Acta Agronómica

Página web: http://bit.ly/Acta_Agronomica_UNpal
ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118
actagronomica_pal@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira
www.palmira.unal.edu.co

Carrera 32 # 12-00, Edificio posgrados, 2^{do} piso
57 (2) 286 8888 Ext.: 35190
Palmira, Valle del Cauca, Colombia, Suramérica