



Acta Agronómica

Vol 69 (2)

abril - junio 2020 / april - june 2020

ISSN 0120 - 2812

e-ISSN 2323-0118



69-2

Sede
Palmira



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Comité Editorial / Editorial Board

John Jairo Cardozo Vásquez

Editor Jefe / in Chief

Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, Colombia
jjcardozov@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, CREA, 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 Rio 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



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:
Marcación XML:

Selene Alarcón Vásquez
Juan Alberto Ramírez Pérez
John Jairo Cardozo Vásquez
Alexander Pereira Mosquera
José Raniere Correa Cárdenas

Créditos fotografía:
Nota:

David Calero Quintero
Toro de Lidia N° 22, de nombre Navidad, encaste Santa Coloma y perteneciente a la ganadería colombiana "Ernesto González Caicedo", Popayán, Cauca, Colombia.

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.
Cinética de eflorescencia grasa en muestras de chocolate oscuro comercial en Perú Kinetic of fat bloom in commercial dark chocolate samples in Peru Aroldo Daza-La Plata, Gabriela-Cristina Chire-Fajardo, Milber-Oswaldo Ureña-Peralta	81
Obtención y caracterización de harinas compuestas de <i>Cucurbita moschata</i> D. y <i>Cajanus cajan</i> L. como fuentes alternativas de proteína y vitamina A Obtaining and characterizing composite flours from <i>Cucurbita moschata</i> D. and <i>Cajanus cajan</i> L as an alternative protein and vitamin A source Yair E. García-Pacheco, Danelys Cabrera, Carlos Alberto Fuenmayor	89
Calidad y protección microbiológica de huevos de mesa por aplicación ultrasónica de agua electrolizada ácida y quitosano Quality and microbiological protection of table eggs by ultrasonic application of acidic electrolyzed water and chitosan Héctor Cabanillas-Beltrán, Ramsés R. González-Estrada, Porfirio Gutiérrez-Martínez, Silvia María. Hernández-López	97
Evaluation of impacts of potato crops and livestock farming in Neotropical high Andean Páramo soils, Colombia Evaluación de impactos del cultivo de papa y la explotación ganadera en suelos de Páramo Neotropical alto Andino, Colombia María-Alejandra Farfán; Sandra-Milena Forero; Lizeth-Manuela Avellaneda-Torres	106
Metabolismo de <i>Echinochloa crusgalli</i> var. <i>mitis</i> como mecanismo de resistencia a imazapyr y imazapic <i>Echinochloa crusgalli</i> var. <i>Mitis</i> metabolism as resistance mechanism to imazapyr and imazapic Joice Fernanda Lübke Bonow, André Andres, Fabiane Pinto Lamego	117
Respuesta agronómica de cuatro variedades de caña de azúcar en los Llanos Orientales de Colombia Agronomic response of four sugarcane varieties in Eastern Plains of Colombia Álvaro Rincón Castillo, Julio Jairo Becerra Campiño	124
Postharvest quality of tomato as affected by nitrogen and sulfur interaction Calidad poscosecha del tomate afectada por la interacción de nitrógeno y azufre Matias Sinueja Júnior, Maria Ligia de Souza Silva, Anderson Ricardo Trevizam,Valdemar Faquin,Deivisson Ferreira da Silva.	130
Water requirements and restrictions to sugarcane in cane plants and ratoon cane cycles in Southern Brazil Requerimientos y restricciones de agua en caña de azúcar plantilla y soca en el sur de Brasil Bruno César Gurski,Jorge Luiz Moretti de Souza,Emerson Gerstemberger,Ricardo Augusto de Oliveira	136
Valoración genética de unidades comportamentales en una ganadería de lidia colombiana Genetic evaluation of behavioral units in a Colombian bullfighting cattle raising David Calero Quintero, José Reinel Uribe Ceballos, Daniel José Bartolomé Rodríguez, Jaime Eduardo Muñoz Flores, María Fernanda González Valencia	145
Caracterización morfo-anatómica y protocolo para estimar la viabilidad de semillas de <i>Psidium guajava</i> Morpho-anatomical characterization and protocol to estimate the viability of <i>Psidium guajava</i> seeds Jorge Ernesto Guevara Ohara, Carlos Iván Cardozo Conde, Luis Guillermo Santos Meléndez	155

*Nota: Los contenidos publicados en el Vol 69 Núm 2, fueron aprobados por Arnulfo Gómez Carabalí, PhD., editor jefe de la revista durante el periodo 2018-2019.

*Note: The contents published in Vol 69 Num 2 were approved by Arnulfo Gómez Carabalí, PhD., Editor-in-chief 2018-2019.

Código QR sitio web



Cinética de eflorescencia grasa en muestras de chocolate oscuro comercial en Perú

Kinetic of fat bloom in commercial dark chocolate samples in Peru

Aroldo Daza-La Plata ¹, Gabriela-Cristina Chire-Fajardo ², Milber-Oswaldo Ureña-Peralta ³

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. ✉ aroldodazalp@gmail.com

² Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. ✉ gchire@lamolina.edu.pe

³ Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. ✉ moup@lamolina.edu.pe

Rec.: 20-05-2019 Acep.: 10-01-2020

Resumen

La eflorescencia de la grasa es un proceso de recristalización que da como resultado un chocolate de superficie opaca y blanca. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la cinética de aparición de este fenómeno evaluando el Índice de Blancura (IB) en chocolate comercial peruano con 45 y 70% de cacao. La cinética fue determinada por el método acelerado de ciclos de temperaturas de 30 ± 1 °C durante 8 h y 20 ± 1 °C durante 16 h a humedades relativas de 30, 50 y 70%. Las mediciones se realizaron cada 48 h (1 día de por medio). Los resultados mostraron que, la humedad relativa no afectó ($P > 0.05$) la cinética de eflorescencia grasa antes de 48 h de almacenamiento. El mayor IB, promedio, observado fue 55.7 ± 0.25 para el chocolate con 70% de cacao, almacenado a 30% de humedad. La cinética de eflorescencia grasa expresada en IB se ajustó a la función exponencial invertida: $IB = IB_f - (IB_f - IB_i) e^{-Kt}$.

Palabras clave: Función exponencial; índice de blancura; método acelerado, cacao, chocolate.

Abstract

The fat bloom is a recrystallization process, resulting in the surface of the chocolate becoming opaque and white. The objective of the research was to determine the kinetics of appearance of the referred phenomenon by evaluating the whiteness index (WI) in Peruvian chocolate for sale with 45 and 70% of cocoa. The kinetics were determined for the accelerated method of temperature cycles with cycles of 30 ± 1 °C (for 8 hours) and 20 ± 1 °C (for 16 hours) at relative humidity of 30; 50 and 70 percent; the measurements were inter-daily. The relative humidity did not significantly influence ($P > 0.05$) in the fat bloom kinetic before 48 hours of storage. The highest average (IB) observed was 55.7 ± 0.25 , reached by chocolate at 70% cocoa, stored at 30% of humidity. The kinetic of fat bloom is given by the inverted exponential function: $WI = WI_f - (WI_f - WI_i) e^{-Kt}$.

Keywords: Accelerated method; exponential function; whiteness index, cacao.

Introducción

La eflorescencia grasa o ‘*fat bloom*’ es un fenómeno caracterizado por la aparición de una película blanca en la superficie del chocolate, lo que disminuye su calidad (Beckett, 2008; James y Smith, 2009). Dicho fenómeno es debido, en gran parte, a la formación de estructuras cristalinas inestables que pueden ser generadas por un deficiente atemperado o malas condiciones de almacenamiento. En manteca de cacao estas formas se clasifican en los tipos I a VI siendo las deseables los tipos V y VI por ser más densas, lo que evita que el chocolate se contraiga (Chire y Hartel, 2011). Beckett (2008) utilizando difracción de rayos X, clasificó el polimorfismo de la manteca de cacao en tres tipos de cristales, identificados como α , β y β' . En el estado líquido la migración de grasa a la superficie del chocolate es originada por una acción de bombeo debido a la diferencia de densidad de la manteca de cacao entre las fases sólida y líquida ocasionada por las fluctuaciones de temperaturas (Pastor-Navarro, 2010).

El desarrollo de la eflorescencia grasa en chocolate durante el almacenamiento puede ser explicado por la separación de fases y la transformación polimórfica, lo que produce una reducción en la calidad sensorial del producto y una separación debido a triglicéridos de bajo y alto punto de fusión, siendo los primeros los causantes de la eflorescencia, lo que se explica por la transformación debida a la transición de cristales de la manteca de cacao de la forma βV a la forma βVI (Bricknell y Hartel, 1998; Ali et al., 2001; Bui y Coad, 2014). Masuchi-Buscato et al. (2018) encontraron que, en almacenamiento a temperaturas oscilantes, la adición de 6% de estearina de manteca de cacao retarda la eflorescencia grasa hasta 45 días, debido a su efecto en la transformación polimórfica de los cristales de este componente. La adición de otras grasas similares puede retardar la formación de la eflorescencia grasa, de acuerdo con el punto de fusión de las mantecas utilizadas (Bahari y Ako, 2018; Biswas et al, 2017; Halim et al., 2019; Jin et al., 2018).

La manteca de cacao está compuesta por una cantidad alta de ácidos grasos saturados como esteárico (21%) y palmítico (20%), y ácidos grasos no saturados como oleico (23%) (Mexis et al., 2010); en dos variedades de cacao peruano se ha encontrado cierta composición de ácidos grasos, respectivamente: 32.8 y 33.9% de esteárico; 32.3 y 32.6% de oleico; 29.3 y 28% de palmítico; 1.1% de araquidónico, 2.9 y 3.1% de linoleico y 0.2 % de linolénico (Chire et al., 2020). Este trabajo tuvo como objetivo determinar la cinética de

eflorescencia grasa en la superficie de muestras comerciales de chocolate peruano evaluando el Índice de Blancura (IB) en muestras con 45% y 70% de cacao.

Materiales y métodos

Tratamientos y diseño experimental. Para el estudio se utilizaron tabletas de chocolate comercial sin envoltura, con 45% y 70% de cacao en su formulación y dimensiones de 2.93 ± 0.12 cm de largo, 2.29 ± 0.09 cm de ancho y 0.9 ± 0.03 cm de espesor, con un peso de 6.07 ± 0.59 g, que fueron almacenadas en cámaras climáticas a 30%, 50% y 70% de humedad relativa, obtenida con soluciones de cloruro de magnesio, bicromato de sodio y cloruro de sodio. El programa de temperaturas cíclicas para simular un almacenamiento acelerado (Zarringhalami et al., 2010) incluyó dos ciclos continuos de temperaturas entre $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 h y $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 h, para un total de 672 horas con mediciones cada 48 horas del Índice de Blancura (IB). En la cámara climática el cambio de temperatura ocurrió de $3.2^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar una reducción a $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ (Climacell®).

Para el análisis de los cambios en el IB se utilizó un diseño experimental de bloques completo al azar con tres repeticiones. Los IB se midieron en muestras almacenadas a 30% (M1), 50% (M2) y 70% (M3) de humedad relativa (HR). Los contenidos de cacao en las muestras fueron de 45% (A) y 70% (B) dispuestos en los bloques del diseño. La cinética de eflorescencia grasa se midió a 0, 48, 144, 192, 288, 336, 504, 552, 624 y 672 horas.

Análisis proximal. En las muestras se midió la humedad (AOAC 931.04, 2016), proteína cruda (AOAC 970.22, 2016), grasa cruda (AOAC 963.15, 2016), ceniza (AOAC 972.15, 2016), fibra cruda (AOAC 985.29, 2016) y carbohidratos totales por diferencia (Álvarez et al., 2007).

Los valores de IB fueron calculados a partir de los valores L^* , a^* y b^* obtenidos de cuatro diferentes posiciones de lectura en la superficie de la tableta de chocolate con el colorímetro Minolta® CR-400, con ángulos variables de 0° , 90° , 180° y 270° . Las mediciones fueron realizadas a 20°C (Pastor-Navarro, 2010). Con los datos obtenidos se calculó el IB, utilizando la ecuación de Lohman y Hartel (1994) (Ecuación 1)

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, IB es el Índice de Blancura, L^* la luminosidad en rango de 0 a 100, a^* la coordenada CieLab en el rango de +60 a -60 que corresponde al intervalo entre rojo y verde, respectivamente,

y b^* es la coordenada CieLab en el rango de +60 a -60 que corresponde de amarillo a azul, respectivamente (Pastor-Navarro, 2010).

Análisis y procesamiento de datos. Para las comparaciones entre tratamientos de humedad relativa se utilizó el análisis de varianza; para el análisis proximal y de IB se utilizó la desviación estándar; la diferencia entre los resultados del análisis proximal; y para las coordenadas CieLab se utilizó la prueba t de Student.

Modelamiento matemático. Según la ecuación de ganancia de humedad (Labuza, 1982) (Ecuación 2), se tiene:

$$IB = IB_f - (IB_f - IB_i)e^{-K\theta} \dots \text{(Ec. 2)}$$

donde; IB es el Índice de Blancura esperado, IB_f es el máximo Índice de Blancura esperado, IB_i es el índice de blancura inicial, θ es el tiempo en horas, y K es la constante de reacción de la eflorescencia grasa en unidades/hora.

Escalamiento. El ajuste por escalamiento consiste en una serie de cambios sucesivos del valor K por iteración hasta obtener el valor K esperado (K_2). Para ello se utilizó el programa Excel® 2007 con el fin de determinar el valor de la constante de reacción en cinética K calculada que explica mejor la cinética de eflorescencia grasa para cada tratamiento. Se utilizó la opción 'ridge regression' del paquete estadístico Statgraphics Centurion 16.1® para relacionar los valores de IB esperado con el IB teórico y determinar de esta forma, el grado de ajuste por el coeficiente de determinación (r^2).

Validación del modelo. La validación se realizó utilizando el valor $RMSE$ o raíz del cuadrado medio del error (Seid y Hensel, 2012) (Ecuación 3).

$$RMSE = \frac{1}{IB_i} * \sqrt{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N (IB_e - IB_t)^2} \text{ (Ec. 3)}$$

donde; $RMSE$ es el cuadrado medio del error, IB_i es el Índice de Blancura inicial, IB_e es el Índice de Blancura experimental, IB_t es el Índice de Blancura teórico, N es el número de repeticiones.

Variación no significativa en cinética (VNSC). Consiste en un procedimiento estadístico que aplica en una primera etapa análisis de varianza y posteriormente, la prueba de comparación de medias de Tukey, teniendo como tratamientos el tiempo y sus valores de rango (Rubio, 2004), considerando los 10 tiempos de almacenamiento como tratamientos y como variable de respuesta los valores de IB . Con el VNSC se determinó el tiempo a partir del cual la cinética de variación del IB no presenta variación significativa ($P > 0.05$), lo que significa un valor de IB constante en el tiempo a partir del cual comienza el final del proceso de eflorescencia.

Resultados y discusión

Análisis proximal. Los valores del promedio del tenor graso de muestras de chocolate con 45% y 70% de cacao, respectivamente, fueron de 32 ± 1.14 y $40.80 \pm 0.09\%$ de la grasa total (Tabla 1).

Tabla 1. Composición proximal de muestras de chocolate peruano (g/100 g).

Composición	Contenido de cacao (%)	
	45 (A)	70 (B)
Humedad	0.55 ± 0.10 a*	1.23 ± 0.06 b
Proteína cruda	5.74 ± 0.04 a	9.70 ± 0.12 b
Grasa cruda	32.00 ± 1.14 a	40.80 ± 0.09 b
Ceniza	1.42 ± 0.10 a	2.34 ± 0.06 b
Carbohidratos totales	60.30 ± 1.04 b	45.92 ± 0.13 a

* Valores seguidos de letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Efecto de la humedad relativa en el almacenamiento. Los valores promedio de IB presentaron un incremento acelerado en las primeras horas de almacenamiento para luego disminuir gradualmente hasta alcanzar un valor constante. Esto se explica considerando la formación de una fase líquida de la materia grasa en la matriz de las muestras, lo que acelera la migración a la superficie durante el cambio de temperatura en el tiempo de almacenamiento (Tabla 2). Altimira et al. (2007) encontraron valores y comportamientos similares a los hallados en el presente estudio; por otra parte, Clercq et al. (2014) encontraron que la migración de grasa no puede ser descrita como una difusión constante o difusión de Fick.

Los datos muestran que, los chocolates comerciales analizados no presentan diferencia de IB por efecto del contenido de cacao ($P > 0.05$), no obstante, el efecto de la humedad relativa mostró diferencias entre algunas muestras ($P < 0.05$). Skrabal et al. (2019) encontraron cambios significativos en la eflorescencia grasa de la superficie de muestras de chocolate elaborados con diferentes contenidos de grasa (mantequilla de cacao, grasa de leche, grasa vegetal) sometidas a cambios de temperatura (20 y 29 °C); así, las muestras almacenadas con una humedad relativa entre 50 y 75% presentaron cambios significativos en la composición de la superficie del producto, igualmente, encontraron que la mezcla de ácidos grasos provenientes de grasas vegetales sustitutas de avellana y manteca de cacao contribuyen a la aparición más rápida de la eflorescencia en comparación con chocolates elaborados sólo con este último producto.

Zarringhalami et al. (2010) y Chire y Hartel (2011) trabajando con ciclos de temperatura similares a los del estudio de Skrabal et al. (2019) obtuvieron un IB máximo de 32, un valor similar al encontrado en el presente estudio. Por el contrario, Flores, Chire y Lescano (2017); Ali et al (2001) encontraron eflorescencia

Tabla 2. Índice de Blancura (IB) promedio a través del tiempo para muestras de chocolate peruano con 45% y 70% de cacao, almacenados en tres niveles de humedad relativa.

Tiempo (horas)	Cacao (%)	Humedad Relativa (%)		
		30%	50%	70%
T1 = 0	45	28.8 ± 0.16b ^a **	28.4 ± 0.15ab	28.8 ± 0.10bb
	70	27.4 ± 0.21aa	27.4 ± 0.17aa	27.3 ± 0.20aa
T2 = 48	45	48.5 ± 2.21ba	47.6 ± 3.86ba	35.6 ± 1.29aa
	70	52.8 ± 0.95cb	51.0 ± 0.91ba	47.9 ± 0.73ab
T3 = 144	45	52.1 ± 2.34ba	46.8 ± 2.65aa	48.4 ± 2.90aa
	70	54.9 ± 0.50ca	49.2 ± 0.72ba	46.3 ± 0.89aa
T4 = 192	45	52.5 ± 2.39ba	45.5 ± 2.10aa	46.3 ± 3.36ba
	70	54.5 ± 0.51ca	47.3 ± 0.97ba	44.2 ± 0.93aa
T5 = 288	45	52.5 ± 2.27ba	45.0 ± 1.97aa	51.7 ± 0.56bb
	70	54.1 ± 0.41ca	45.9 ± 0.78ba	44.5 ± 0.28aa
T6 = 336	45	52.7 ± 2.04ba	45.6 ± 2.23aa	52.0 ± 0.90bb
	70	54.1 ± 1.85ca	46.2 ± 0.82ba	42.8 ± 1.20aa
T7 = 504	45	51.6 ± 2.27ba	44.5 ± 1.77aa	51.9 ± 0.46bb
	70	52.9 ± 0.98ca	43.5 ± 0.75ba	40.5 ± 1.21aa
T8 = 552	45	53.1 ± 2.06ba	46.6 ± 1.77aa	52.7 ± 0.57ba
	70	54.8 ± 0.41ca	46.1 ± 0.71ba	41.8 ± 1.18aa
T9 = 624	45	52.2 ± 2.05ca	44.5 ± 1.77aa	50.3 ± 0.60bb
	70	53.5 ± 0.44ca	43.5 ± 0.75ba	37.2 ± 1.41aa
T10 = 672	45	54.4 ± 1.76ca	47.7 ± 1.78aa	53.1 ± 0.54bb
	70	55.7 ± 0.25ca	47.4 ± 0.64ba	42.3 ± 0.99aa

* Letras diferentes en cada línea indican significancia ($P < 0.05$) entre valores de humedad relativa. **Letras diferentes en cada columna indican diferencia ($P < 0.05$) entre tiempos de evaluación.

atrasada después de 24 h de observación. Esto último puede ser debido a la composición de la formulación del chocolate, la adición de grasas sustitutas y emulsificantes que retardan la eflorescencia grasa. En estas evaluaciones es necesario tener en cuenta el tamaño de las partículas de chocolate ya que estas forman poros que facilitan la migración de grasa a la superficie (Afoakwa et al., 2009). Dahlenborg et al. (2015) encontraron que a menor tamaño de partícula la migración de grasa es acelerada. Utilizando microscopia de barrido laser 3D-LSCM se puede determinar la eflorescencia grasa desde sus etapas iniciales (pre-eflorescencia grasa) y determinar las partículas de grasa que empiezan a migrar a la superficie (Ashida et al., 2020).

Las temperaturas cíclicas de almacenamiento generan la aparición de la eflorescencia grasa de forma acelerada, debido a que el incremento de temperatura favorece una mayor fase líquida de la manteca de cacao que tiende a subir a la superficie. Se ha demostrado que los chocolates almacenados a temperaturas cíclicas de 20-32 °C muestran mayor eflorescencia grasa respecto a temperaturas cíclicas de 20-29 °C (Huanhuan y Bryoni, 2018).

Altos contenidos de azúcar en la superficie del chocolate pueden generar un fenómeno conocido como eflorescencia de azúcar o 'sugar bloom', que se manifiesta como una capa blanquecina en la superficie parecida a la eflorescencia grasa

y se desarrolla por la reacción de la humedad del ambiente con los azúcares (Bricknell y Hartel (1998); Ghosh et al. (2005). Este fenómeno puede ocasionar un error en la lectura para determinar la eflorescencia grasa.

Modelamiento matemático de la cinética de eflorescencia grasa. La cinética de eflorescencia es explicada por una migración de grasa desde la matriz del chocolate hacia la superficie hasta conseguir un equilibrio (Dahlenborg, 2014; Galdámez et al, 2009). Comportamiento similar al observado en la migración de agua durante un proceso de deshidratación y que es definido por una ecuación exponencial invertida (Labuza, 1982). Con base en esa similitud en el comportamiento de migración de la materia, se ajustó la ecuación de Labuza (1982) para describir el fenómeno de eflorescencia grasa con base en una ecuación exponencial invertida (Ecuación 4).

$$\ln \left(\frac{mi-me}{m-me} \right) = \left(\frac{P}{X} \right) * \left(\frac{A}{Ws} \right) * \left(\frac{po}{b} \right) * \theta \quad (\text{Ec. 4})$$

que puede ser expresada como (Ecuación 5)

$$m = me - (me - mi)e^{-\left(\frac{P}{X}\right)*\left(\frac{A}{Ws}\right)*\left(\frac{po}{b}\right)*\theta} \quad (\text{Ec. 5})$$

donde, me es la humedad de equilibrio (g H_2O /g sólido), mi es la humedad inicial (g H_2O /g sólido), m es la humedad esperada (g H_2O /g sólido), po es la presión parcial del vapor del agua (cm de Hg), A es el área de contacto con el medio ambiente (m^2), Ws es el peso seco del producto (g), P es la constante de permeabilidad (g/ m^2 por día), X es el espesor del empaque, b es la pendiente, θ es el tiempo (horas).

Para adaptar la ecuación 5 de la curva de migración de agua a partir de la ecuación de Labuza (Ecuación 4) a la cinética de eflorescencia grasa, se reemplazaron en la ecuación los valores de ganancia de humedad (m) por los de índice de blancura (IB). Los valores $(P/X)*(A/Ws)*(po/b)$ fueron considerados como el factor K en unidades/h, denominado para este estudio como constante de reacción de eflorescencia grasa.

Los valores K fueron obtenidos mediante la tabulación de los resultados reales utilizando el software Microsoft® Excel® y la ecuación 7, a continuación, se determinó el promedio de los valores de K teórica/calculada (K1) que aparecen en la Tabla 3, donde se asumió que el IB_{fo} Índice de Blancura final corresponde a la manteca de cacao (IB = 60.9), punto en el cual las muestras alcanzaron el equilibrio. El IB_i es el Índice de Blancura inicial que se obtuvo del promedio de los valores de IB tomados al comienzo de la prueba.

Para elaborar el gráfico de la cinética de eflorescencia grasa teórica (Figura 1) se utilizaron los valores de K teórica/K calculada. Para

determinar el IB en la cinética de eflorescencia grasa, los resultados de Índice de Blancura teóricos fueron modelados con la Ecuación 6 adaptada de Labuza (1982), de la forma siguiente

$$IB = IB_f - (IB_f - IB_i)e^{-K\theta} \quad (\text{Ec. 6})$$

Despejando la constante K a partir de la ecuación 7, se tiene:

$$K = \left(\frac{-1}{\theta}\right) * \text{Ln}\left(\frac{IB_f - IB_i}{IB - IB_i}\right) \quad (\text{Ec. 7})$$

Tabla 3. Elementos de la curva de cinética de eflorescencia grasa, coeficiente de determinación y probabilidad antes del escalamiento y ajuste por iteración en muestras comerciales de chocolates de Perú (n = 2).

Tratamiento*	IBf	IBi	K1/h	r ²	Signif.
M1A	60.9	28.8	0.006	0.697	P > 0.05
M2A	60.9	28.4	0.004	0.362	P < 0.05
M3A	60.9	28.8	0.004	0.856	P < 0.05
M1B	60.9	27.4	0.008	0.643	P > 0.05
M2B	60.9	27.4	0.005	0.206	P < 0.05
M3B	60.9	27.3	0.004	0.057	P < 0.05

* Las características de las muestras y los tratamientos se presentan en la Tabla 1 y Tabla 2.

Escalamiento. El ajuste por escalamiento consiste en una serie de cambios sucesivos del valor K por iteración hasta alcanzar el valor K esperado (K2) o constante de reacción de eflorescencia grasa ajustada por escalamiento, el cual se expresa como coeficiente de determinación (r² > 0.85), valor que indica una buena correlación entre los datos (Prieto et al., 2012). En la presente investigación se hizo un escalamiento gráfico con distintos valores del factor K utilizando el software Excel® 2007 y la opción ‘ridge regression’ del programa Statgraphic Centurion 16.1®, para relacionar los valores IB reales e IB esperados y obtener así, el valor de K calculado que mejor modela la cinética de eflorescencia grasa para cada tratamiento (Briones y Aguilera, 2005). Los valores K después del escalamiento (K2) con los cuales se alcanzaron y los valores más altos de r² se incluyen en las Tablas 4 y 5. Se observa que solo en el tratamiento M3B ocurre un valor < 0.85. Los niveles de significancia para cada uno de los modelos fueron > 0.05, lo que indica baja correlación de la variación de IB con respecto al tiempo, por tanto, se sugiere agregar una variable independiente más de estudio a los modelos, como el contenido de sacarosa en el chocolate.

Tabla 4. Valores de la constante de reacción de eflorescencia grasa (K/h): teórica calculada (K1) y teórica calculada ajustada por escalamiento (K2).

Tratamiento	K1	K2
M1A	0.006	0.040
M2A	0.004	0.070
M3A	0.004	0.010
M1B	0.008	0.050
M2B	0.005	0.250
M3B	0.004	0.150

Tabla 5. Elementos de la curva de cinética de eflorescencia grasa, coeficiente de determinación y significancia después del escalamiento y ajuste por iteración en muestras de chocolate peruano.

Tratamiento	IBf	IBi	K2/h*	r ²	Signif.
M1A	54.4	28.8	0.040	0.990	P > 0.05
M2A	47.7	28.4	0.070	0.949	P > 0.05
M3A	53.1	28.8	0.010	0.970	P > 0.05
M1B	55.7	27.4	0.050	0.991	P > 0.05
M2B	51.0	27.4	0.250	0.876	P > 0.05
M3B	47.9	27.3	0.150	0.733	P > 0.05

*K2 expresado como valor K constante de reacción de la eflorescencia grasa.

En la Tabla 6 se observan las ecuaciones de ajuste de la cinética de eflorescencia grasa para los tratamientos con r² > 0.85, y en la Figura 1 las correlaciones para la cinética de la eflorescencia grasa experimental, K teórica calculada (K1), y K ajustada por iteración (K2) para los tratamientos M1A (a), M1B (b), M2A (c), M2B (d), M3A (e) y M3B (f).

Tabla 6. Ecuaciones de ajuste de la cinética de eflorescencia grasa para los tratamientos con factor de determinación r² > 0.85 en muestras de chocolate peruano.

Tratamiento	Ecuación
M1 A	IB = 54.4 - (54.4 - 28.8) e ^(-0.04*θ)
M1 B	IB = 55.7 - (55.7 - 27.4) e ^(-0.05*θ)
M2 A	IB = 47.7 - (47.7 - 28.4) e ^(-0.07*θ)
M2 B	IB = 51.0 - (51.0 - 27.4) e ^(-0.25*θ)
M3 A	IB = 53.1 - (53.1 - 28.8) e ^(-0.01*θ)

Validación de resultados. El valor de la raíz cuadrada del error (RMSE) indica el ajuste de los datos experimentales a los modelados en relación con la cantidad de puntos que tiene la gráfica (Seid y Hensel, 2012). Para la validación de la cinética de eflorescencia grasa para el tratamiento M3B, que fue la de menor valor de r², se utilizó la ecuación 3, de raíz cuadrada del error. El valor (10.7%) de RMSE obtenido para el tratamiento M3B (Figura 2) es similar al límite del rango superior encontrado por Sánchez-Silva et al. (2007).

VNSC. Una vez fueron obtenidas las significancias (P < 0.05) entre los valores de IB correspondientes a los distintos tratamientos (10 tiempos, entre T1 = 0 y T10 = 672 h) (Tabla 2), se utilizó la prueba de Tukey para la comparación entre los pares de valores de IB correspondientes a tiempos contiguos (Tabla 7), encontrando que a partir de la comparación T4 vs. T3, no se observaron diferencias significativas (P > 0.05) (Figura 1). Lo anterior permite deducir que en el caso de los tratamientos M1A y M2A a partir de 144 horas (T3), los valores de IB se conservan en un valor promedio de 52.64 ± 0.78 y 54.31 ± 0.86 para las muestras con 45% de cacao sometidas a 30% y 50% de humedad relativa, respectivamente. Un comportamiento similar se observó en los tratamientos M1B (70% de cacao, 30% de HR),

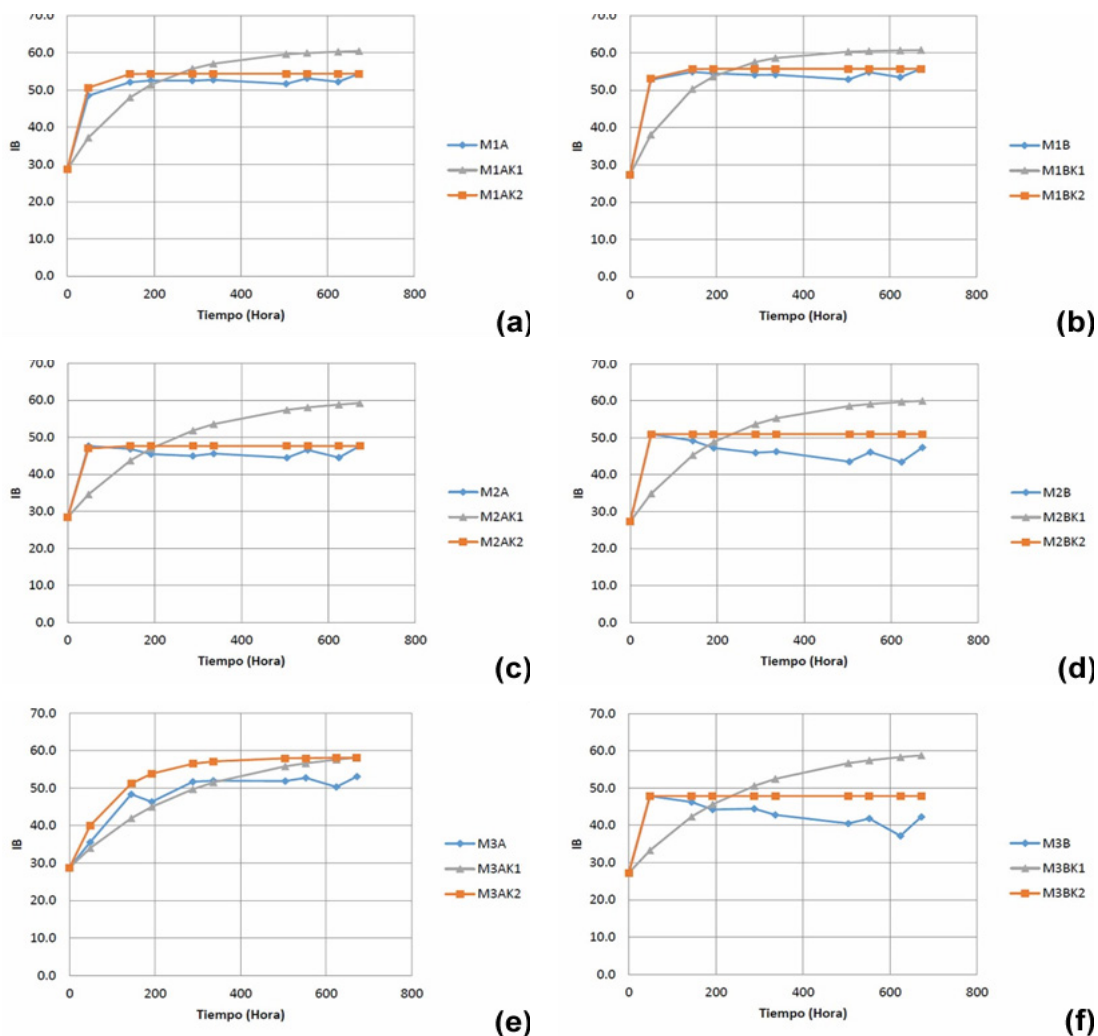


Figura 1. Cinética de la eflorescencia grasa experimental, K teórica calculada (K1) y K ajustada por iteración (K2) para los tratamientos M1A (a), M1B (b), M2A (c), M2B (d), M3A (e) y M3B (f).

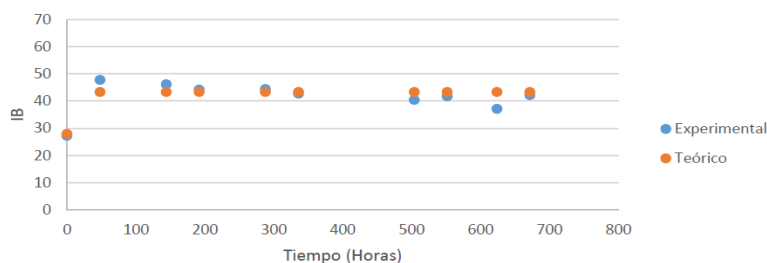


Figura 2. Cinética de eflorescencia grasa (expresado como Índice de Blancura, IB) experimental y teórica del tratamiento M3B por RMSE.

M2B (70% de cacao, 50% de HR), M3A (45% de cacao, 70% de HR) y M3B (70% de cacao, 70% de HR), que no presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre valores de IB, cuando se compararon por pares (T4 vs. T3, T6 vs. T5, T6 vs. T5 y T5 vs. T4), correspondiendo a cada uno de estos tratamientos los valores promedio de IB: 45.78 ± 1.08 ; 45.43 ± 1.45 ; 51.95 ± 0.88 y 41.9 ± 2.3 , respectivamente.

Con los promedios de los valores IB finales (Tabla 5), es posible decir que los valores más altos corresponden a muestras de chocolates con mayor cantidad de cacao (70%), en una atmósfera de menor humedad relativa (30%); ya que, con mayor cantidad de grasa presente en la composición, mayor es la celeridad de formación de la eflorescencia grasa, favorecida por la menor humedad de almacenamiento. Esto último debido

a una menor presencia de moléculas de agua en la superficie que repelen la presencia de grasa. Esta observación fue corroborada parcialmente con los valores de eflorescencia alcanzados por los demás tratamientos de menor IB, que mostraron alta dispersión de sus valores alcanzando, en algunos tiempos, reducciones e incrementos en los valores de IB después de llegar a un IB alto, pero sin exceder el valor máximo de este índice. Estas variaciones se explican por los cambios en los valores de los componentes L^* , a^* y b^* de la ecuación del IB.

Tabla 7. Significancia por la prueba VNSC de las comparaciones pareadas de los tratamientos contiguos.

Comparación entre valores de IB	Tratamientos					
	M1A	M1B	M2A	M2B	M3A	M3B
T2-T1	S	S	S	S	S	S
T3-T2	S	S	NS	S	S	S
T4-T3	NS	NS	NS	S	S	S
T5-T4	NS	NS	NS	S	S	NS
T6-T5	NS	NS	NS	NS	NS	S
T7-T6	NS	S	NS	S	NS	S
T8-T7	NS	S	NS	S	NS	S
T9-T8	NS	S	NS	S	S	S
T10-T9	NS	S	NS	S	S	S

*S=diferencia significativa /NS=diferencia no significativa.

Conclusión

Las muestras de chocolate con 70% de cacao presentaron mayor contenido graso ($40.80 \pm 0.09\%$) que con 45% de este componente. La humedad relativa y el contenido de cacao no tuvieron influencia significativa ($P > 0.05$) en la eflorescencia grasa dentro de las 48 h de almacenamiento, luego ésta presentó un comportamiento asintótico en el tiempo, llegando a un valor IB constante, cuyo promedio fue mayor en muestras de chocolates con mayor cantidad de cacao (70%) y menor humedad relativa de almacenamiento (30%).

La cinética de eflorescencia grasa se ajustó al modelo exponencial: $IB = IB_f - (IB_f - IB_i) e^{-k_0 t}$ con un coeficiente de determinación esperado de $r^2 > 0.85$ ($P < 0.05$) por lo que se recomienda incorporar una variable más de estudio al modelo para mejorar el grado de predicción, como puede ser considerar la cantidad de sacarosa adicionada a las formulaciones de chocolates.

Referencias

Afoakwa E.O.; Paterson A.; Fowler M.; Vieira J. 2009. Fat bloom development and structure-appearance relationships during storage of under-tempered

- dark chocolates. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.011>
- Ali A.; Selamat J.; Man Y.B.C.; Suria A.M. 2001. Effect of storage temperature on texture, polymorphic structure, bloom formation and sensory attributes of filled dark chocolate. *Food Chemistry*, 72, 491–497. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00271-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00271-5)
- Altimira P.; Pyle L.; Bouchon P. 2007. Structure–fat migration relationships during storage of cocoa butter model bars: Bloom development and possible mechanisms. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.022>
- Álvarez C.; Pérez E.; Lares, M. 2007. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. *Agronomía Tropical*, 57(4), 249–256. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0002-192X2007000400001&script=sci_arttext&lng=pt
- AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC international. AOAC, Ed.) (20th edition. AOAC Maryland, USA.
- Ashida H.; Morita A.; Karatani N.; Sato R.; Sato K. 2020. Surface topographic analysis of early stages of fat bloom of dark chocolate with 3D-laser scanning confocal microscopy (3D-LSCM). *Food structure*, 23, 100136. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100136>
- Bahari P.; Akoh C. 2018. Texture, rheology and fat bloom study of ‘chocolates’ made from cocoa butter equivalent synthesized from illipe butter palm mid-fraction. *LWT- Food Science and Technology*, 97, 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.013>
- Beckett, S. 2008. *The Science of Chocolate*. Royal Society of Chemistry 2nd ed.240 p.
- Biswas N.; Cheow Y.; Tan C.; Siow L. 2017. Physical, rheological and sensorial properties, and bloom formation of dark chocolate made with cocoa butter substitute (CBS). *LWT- Food Science and Technology*, 82, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.039>
- Bricknell J.; Hartel R.W. 1998. Relation of fat bloom in chocolate to polymorphic transition of cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 75(11), 1609–1615. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0101-0>
- Briones V.; Aguilera J. 2005. Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.002>
- Bui, L.; Coad, R. 2014. Military ration chocolate: The effect of simulated tropical storage on sensory quality, structure and bloom formation. *Food chemistry*, 160, 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.084>
- Chire G.; Hartel R.W. 2011. Efecto de diferentes emulsificantes en las propiedades reológicas y la eflorescencia grasa del chocolate oscuro. *Anales Científicos*, 72(1), 1–12. <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v72i1.852>
- Chire G.; Ureña M.; Hartel R. 2020. Fatty acid profile and solid fat content of peruvian cacao for optimal

- production of trade chocolate. *Rev Chil Nutr.*, 47(1): 50-56. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000100050>
- Clercq N.; Depypere F.; Delbaere C.; Nopens I.; Bernaert H.; Dewettinck K. 2014. Influence of cocoa butter diacylglycerols on migration induced fat bloom in filled chocolates. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (10), 1388–1399. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300476>
- Dahlenborg H. 2014. *Fat bloom on chocolate confectionery systems - From core to surface*. Doctoral thesis. Lund: Department of food technology, engineering and nutrition, Faculty of engineering LTH, Lund University. [https://portal.research.lu.se/portal/en/publications/fat-bloom-on-chocolate-confectionery-systems--from-core-to-surface\(5dbc4c31-918f-46a2-aa09-571614afd9f3\)/export.html](https://portal.research.lu.se/portal/en/publications/fat-bloom-on-chocolate-confectionery-systems--from-core-to-surface(5dbc4c31-918f-46a2-aa09-571614afd9f3)/export.html)
- Dahlenborg H.; Millqvist-Fureby A.; Bergenstahl, B. 2015. Effect of particle size in chocolate shell on oil migration and fat bloom development. *Journal of Food Engineering*, 146, 172-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.008>
- Flores N.; Chire G.; Lescano C. 2017. Rheological, fat bloom, and sensory acceptability effects of mango kernel fat and palm olein blends on chocolate-flavored coatings. *Acta Agronómica* 66(4), 506-511. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n4.56219>
- Galdámez J.R.; Szlachetka K.; Duda J.L.; Ziegler G.R. 2009. Oil migration in chocolate: A case of non-Fickian diffusion. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.11.003>
- Ghosh V.; Ziegler G.R.; Anantheswaran R. 2005. Moisture migration through chocolate flavored confectionery coatings. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.012>
- Halim H.; Selemat J.; Mirhosseini S.; Hussain N. 2019. Sensory preference and bloom stability of chocolate containing cocoa butter substitute from coconut oil. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18(4), 443-448. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.02.005>
- Huanhuan Z.; Bryoni J. 2018. Fat bloom formation on model chocolate stored under steady and cycling temperatures. *Journal of Food Engineering*, 249, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.12.008>
- James, B.; Smith, B. 2009. Surface structure and composition of fresh bloomed chocolate analysed using x-ray photoelectron spectroscopy, cryo-scanning electron microscopy and environmental scanning electron microscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 929–937. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.003>
- Jin J.; Jin Q.; Wang X.; Akoh C. 2018. Improving heat and fat bloom stabilities of “dark chocolates” by addition of mango kernel fat-based chocolate fats. *Journal of Food Engineering*, 246, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.027>
- Labuza, T. 1982. *Moisture gain and lose in package foods*. T. Labuza, Ed. Food technology. USA. 97 p
- Lohman, M.; Hartel, R.W. 1994. Effect of milk fat fractions on fat bloom in dark chocolate. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 71(3), 267–276. <https://doi.org/10.1007/BF02638052>
- Masuchi-Buscato, M.; Hara, L.; Bonomi, E.; Calligaris, G. A.; Cardoso, L. P.; Grimaldi, R.; Kieckbusch, T. G. 2018. Delaying fat bloom formation in dark chocolate by adding sorbitan monostearate or cocoa butter stearin. *Food Chemistry*, 256, 390-396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.127>
- Mexis, S.F.; Badeka, A.V.; Riganakos, K.A.; Kontominas, M.G. 2010. Effect of active and modified atmosphere packaging on quality retention of dark chocolate with hazelnuts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.09.001>
- Pastor-Navarro, C. 2010. *Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metil: caracterización y aplicación*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/8534>
- Prieto, J.; Prieto, F.; Román, A.D.; Otazo, E.M. 2012. Correlation of mathematical models of adsorption of humidity in cereal for breakfast. *Avances en Ciencia e Ingeniería ACI*, 3(1), 137–150. <https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/5363/>
- Rubio, D. 2004. Determinación del tiempo óptimo de homogenización de partículas en un mezclador de volteo tipo pantalón. Tesis pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/>
- Sánchez-Silva, A.; Cruz-Freire, J. M.; Sendón-García, R.; Franz, R.; Paseiro-Losada, P. 2007. Time temperature study of the kinetics of migration of DPBD from plastic into chocolate, chocolate spread and margarine. *Food Research International*, 40(6), 679–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.012>
- Seid R.; Hensel, O. 2012. Experimental evaluation sorption isotherms of chilli pepper: an Ethiopian variety, Mareko fana (*Capsicum annun L.*). *Agricultural Engineering International CIGR Journal*, 14(4), 163–172. <https://cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/view/2187>
- Skrabal S.; Ackar D.; Babic J.; Milicević B.; Jozinovic A.; y Subaric D. 2019. Effect of different storage conditions on fat bloom formation in different types of chocolate. *Food in health and disease : scientific-professional journal of nutrition and dietetics*, 8(2), 97-104. https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=334633&lang=en
- Zarringhalami S.; Sahari M.A.; Barzegar M.; y Hamidi-esfehani Z. 2010. Enzymatically modified tea seed oil as cocoa butter replacer in dark chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3), 540–545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02162.x>

Obtención y caracterización de harinas compuestas de *Cucurbita moschata* D. y *Cajanus cajan* L. como fuentes alternativas de proteína y vitamina A

Obtaining and characterizing composite flours from *Cucurbita moschata* D. and *Cajanus cajan* L as an alternative protein and vitamin A source

Yair E. Garcia-Pacheco¹, Danelys Cabrera², Carlos Alberto Fuenmayor³

¹ Universidad del Atlántico, Grupo de Investigación Agroindustrial-GIA, Barranquilla, Colombia. ✉ yairengpa@hotmail.com

² Universidad de la Costa, Grupo de investigación PRODUCOM, Barranquilla, Colombia. ✉ dcabrera4@cuc.edu.co

³ Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá, Colombia. ✉ cafb83@gmail.com

Rec.: 2019-06-13 Acep.: 2020-02-17

Resumen

Se estudió la utilización de guandul (*Cajanus cajan* L.) y ahuyama (*Cucurbita moschata* D.) como alternativas nutricionales y tecnológicamente viables para la elaboración de harinas compuestas con destino a la preparación de productos alimenticios ricos en proteína y vitamina A de consumo tradicional por la población colombiana. Para el efecto se evaluaron las principales etapas del procesamiento de las matrices vegetales durante la conversión en harinas. La composición nutricional fue determinada incluyendo el contenido de carotenoides totales de la harina de ahuyama y el perfil de aminoácidos de la proteína de la harina de guandul. Las harinas fueron caracterizadas por la distribución del tamaño de partículas y sus propiedades funcionales. Se encontró que a partir de ambas matrices es posible obtener productos tipo harina, con propiedades aptas para su aprovechamiento a escala comercial como fuentes concentradas de nutrientes. Para confirmar los resultados, las harinas fueron empleadas en mezclas proporcionadas para elaborar productos (bebida, arepa y pan) en formulaciones que cumplen con los descriptores: 'alto' en vitamina A y 'alto' o 'bueno' en proteína, además de buenas características de aceptabilidad sensorial. En el estudio se evidenció que las harinas compuestas son fuentes excelentes de proteína y vitamina A en productos tipo colada. Los porcentajes de aporte de harina de guandul se establecieron entre 81.78% y 74.95% y los de harina de ahuyama entre 18.22% y 25.05%, para alcanzar los valores establecidos en dietas de nutrientes tanto para niños mayores de 4 años como para adultos. La harina compuesta correspondiente a la formulación alta en proteína y vitamina A es una alternativa para la elaboración de bebidas ricas en estos nutrientes para la población colombiana, ya que cumple con todos los requerimientos de la legislación colombiana.

Palabras clave: Alimento funcional; Aminoácidos esenciales; Carotenoides; Nutrición; Proteína.

Abstract

Use of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) and ahuyama (*Cucurbita moschata* D.) was studied as a nutritional and technologically viable alternative for the elaboration of composite flour for food products preparation rich in protein and vitamin A for traditional consumption by the Colombian population. For this purpose, the main stages of the processing of the vegetable matrices during the conversion into flours were evaluated. The nutritional composition was determined including the total carotenoid content of the squash flour and the amino acid profile of the protein of the pigeon pea flour. Flours were characterized by particle size distribution and functional properties. It was found that from both matrices it is possible to obtain flour-type products, with properties suitable for their use on a commercial scale as concentrated sources of nutrients. To confirm the results, the flours were used in mixtures provided to produce food products (drink, arepa and bread) in formulations that meet the descriptors: 'high' in vitamin A and 'high' or 'good' in protein, as well as good sensory acceptability characteristics. The study showed that composite flours are excellent sources of protein and vitamin A for beverages. The percentages of contribution of pigeon pea flour were established between 81.78% and 74.95% and those of ahuyama flour between 18.22% and 25.05%, to reach the values established in nutrient diets both for children over 4 years of age and for adults. The composite flour corresponding to the formulation high in protein and vitamin A is an alternative for the elaboration of beverages rich in these nutrients for the Colombian population, since it complies with all the requirements of Colombian legislation.

Key word: Carotenoids; Essential amino acids; Functional food; Nutrition; Protein.

Introducción

La situación nutricional de la población es un indicador de su nivel de bienestar, una medida que permite identificar los niveles de inequidad que afectan su productividad (FAO, 2017). Las deficiencias nutricionales que se presentan en la alimentación diaria de la población se manifiestan por retraso en el crecimiento de los niños, lo cual se relaciona con un menor desempeño escolar, menor productividad y menor ingreso laboral en la edad adulta (Rodríguez et al., 2016).

Colombia enfrenta problemas de desnutrición, a pesar de que los indicadores negativos de seguridad alimentaria han disminuido con respecto a otros países del continente. Aún hoy, 13% de los colombianos se encuentra por debajo de los niveles recomendados de nutrición, el 13.5% de los menores de 5 años presenta desnutrición crónica y la tasa de muertes por esta razón es de 5 por cada cien mil habitantes (Ministerio de Salud y Protección Social, 2016). Una de las causas principales de la desnutrición crónica en la población colombiana la constituye el consumo deficiente de alimentos con una adecuada densidad de nutrientes durante la etapa de crecimiento y desarrollo (Guzmán, 2017). En este contexto factores como el bajo poder adquisitivo para acceder a alimentos de buena calidad y el desconocimiento de los valores nutritivos que algunos alimentos aportan, contribuyen al aumento en el nivel de desnutrición (Osorio et al., 2018).

La dieta de la población colombiana se caracteriza por sus bajos niveles de proteína, minerales (calcio, hierro) y vitaminas (riboflavina, vitamina A, tiamina) (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015). Las leguminosas constituyen una fuente importante de proteína (18 - 32%) (Navarro et al., 2014), péptidos bioactivos y fibra, frecuentemente utilizadas como materias primas en la industria alimentaria (Navarro et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la utilización de las especies vegetales guandul (*Cajanus cajan* L.), una leguminosa utilizada en la culinaria tradicional del Caribe colombiano, y ahuyama (*Cucurbita moschata* D.), una hortaliza con alto potencial agroindustrial, como alternativas viables para elaborar productos alimenticios en forma de harinas como ingredientes de consumo masivo.

Materiales y métodos

Obtención de harinas

La harina de ahuyama fue obtenida mediante secado por convección de muestras en bandejas Binder modelo FD115, a una velocidad de entrada

de aire fija (10 m/s), temperatura de 68 °C, curva calibrada utilizando el modelo de Page y posterior molienda en un molino rotatorio KSW 3306 Clatronic (García-Pacheco et al., 2016). Para la obtención de la harina de guandul los granos fueron procesados en un molino de disco Victoria® Gearbox VH3, con motor RATIO 1.75 a 1650 r.p.m.; las harinas fueron tamizadas y la caracterización de la granulometría se realizó utilizando una columna de ocho tamices de acero inoxidable marca Endecotts® (Inglaterra), Modelo ASTM E-11:95.

Caracterización fisicoquímica

Para esta caracterización se tomaron muestras de 250 g de harina para posterior análisis los Laboratorios de Química y Farmacia de la Universidad del Atlántico, Colombia, siguiendo la metodología AOAC (AOAC International, 2012) para pH (método 981.12), humedad (método 925.09), cenizas (método 923.03), fibra total método (991.43), grasa cruda (método 920.39), proteína (método 960.52) y carbohidratos (método 939.03). Para la determinación de carotenoides totales se utilizó espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, utilizando equipo modelo Life Science Genesys 10S UV-Vis BI (Jaeger et al., 2012).

Propiedades funcionales

La evaluación de las propiedades funcionales de las harinas se realizó siguiendo la metodología descrita por García-Pacheco et al. 2019. Para medir la capacidad de absorción de agua (CAA) se preparó una mezcla de 1 g de harina en 10 ml de agua destilada, la cual permaneció en reposo antes de someterla a centrifugación por 30 min a 3000 r.p.m.; se eliminó el sobrenadante y la diferencia de masas fue equivalente a la cantidad de agua absorbida. Para determinar la capacidad de absorción de aceite (CAG) se siguió un procedimiento similar al anterior utilizando 10 ml de aceite vegetal; finalmente, la capacidad de formación de espuma (CFE) se determinó colocando 2 g de muestra en suspensión en 100 ml de agua destilada, posteriormente, después de un licuado durante 2 min, se midió la diferencia de volúmenes (García-Pacheco et al., 2019).

Perfil de aminoácidos de proteína de guandul

Para cuantificar el contenido de aminoácidos en la harina de guandul se utilizó el método HPLC con detección UV-Vis. Como estándares se emplearon L-aminoácidos. Se utilizó un equipo de HPLC Shimadzu con bombas LC-10 AD VP117 y autoinyector SIL10 AD VP con un sistema

controlador SCL- 10 AD VP y un detector UV SPD10A, de acuerdo con el método propuesto por Castillo et al. (2011).

Formulación de harinas compuestas

Las formulaciones de los productos con base en las harinas resultantes fueron establecidas de acuerdo con el valor de referencia para productos con contenidos de nutrientes ‘alto’ y ‘buena fuente’, para el efecto se utilizaron porciones de 5 – 10 g para proteína y de 500 - 1000 UI para vitamina A como niveles adecuados para niños mayores de 4 años y para adultos, según lo establecido por la Resolución 333 de 2011 (Ministerio de la Protección Social, 2011). El aporte de harina de ahuyama se ajustó con base en la pérdida estimada y corregida según un factor de pérdida definido y establecido por De Moura F. (2015). El aporte de las harinas se calculó según la Ecuación 1, 2 y 3, de la siguiente manera:

$$\frac{g \text{ de harina}}{100 \text{ g de producto}} = \frac{g \text{ de harina que aporta al V.D.}}{\text{Porción del producto}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$g \text{ de harina que aporta al V.D.} = V.D. (g) \times 0.2 \times 100 \text{ g} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\frac{g \text{ de harina}}{100 \text{ g de producto}} = \frac{V.D.(\text{nutriente en g}) \times 0.2 \times 100 \text{ g}}{\% \text{ Nutriente} \times P. \text{ Porción (g)}} \times 100 \times F. \text{ Ret} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde, *V.D.* = valor de referencia (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015); %*Nutriente* = cantidad de nutriente aportado por 100 g; *P.* = porción: peso de la porción en gramos; *F.Ret.* = factor de retención de vitamina A 30%

Elaboración de productos y evaluación sensorial

Para cumplir con los requisitos ‘alto’ y ‘buena fuente’, se elaboraron tres distintos productos con formulaciones de las harinas compuestas y una bebida tipo colada con características de alto contenido de proteína y vitamina A: (1) una preparación con la harina agregada en agua y sometida a cocción durante 30 min a temperatura de ebullición, adicionando azúcar (120 g/litro de bebida), canela y clavos de olor; (2) un producto tipo pan alto en proteína y vitamina A con la adición de harina compuesta, agua, levadura, sal, azúcar y aceite vegetal, que fue amasado y horneado a 250 °C por 30 minutos y, (3) un producto tipo arepa buena fuente de proteína y alto en vitamina A, el cual se preparó adicionando agua (40 °C) y sal, antes de ser amasado y asado.

La evaluación sensorial de los productos se realizó utilizando 50 panelistas entrenados, empleando la escala hedónica Peryamm y Pilgrim de cinco niveles, descrita por Lim (2011) que fue aplicada a cuatro de las características de los productos (apariencia, aroma, sabor y textura) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala hedónica utilizada para la evaluación sensorial de los productos obtenidos utilizando *Cucurbita moschata* D. y *Cajanus cajan* L. (Fuente: Lim, 2011).

Puntaje	Categoría
1	No me gusta nada
2	No me gusta
3	No me gusta ni me disgusta
4	Me gusta
5	Me gusta mucho

Análisis estadístico

La curva de secado de muestras de ahuyama se modeló utilizando el software Python 3.5.1 (Python Software Foundation); los datos resultantes de las pruebas de aceptabilidad sensorial fueron graficados utilizando el software Boxplot Multiple para los diagramas de caja y bigotes; y para la composición nutricional de las formulaciones se realizó un análisis de varianza usando el programa estadístico Stargraphics® Centurión XVI.

Resultados

Secado de materiales

En la Figura 1 se observa que las láminas de ahuyama alcanzaron la humedad en equilibrio (12%) después de 6 h y temperatura de 68 °C. El contenido de carotenoides en la pulpa deshidratada en estas condiciones presentó una pérdida de humedad de 75.8%, con un contenido de carotenoides de 151.2 ± 2.2 µg/g (83.9 ± 1.2 UI/g de vitamina A).

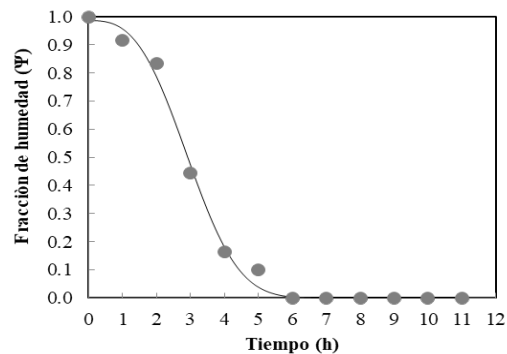


Figura 1. Curvas de secado a 68 °C de láminas de ahuyama (*C. moschata*). Puntos: datos experimentales. Líneas: modelo matemático de Page.

Tamizado de harinas

La granulometría de las harinas permitió determinar el porcentaje de acumulación de granos retenidos por las mallas de los tamices empleados. En este proceso, en la harina de ahuyama fueron identificados tamaños de partículas que variaron desde 75 hasta 150 μm , y en la harina de guandul se identificó una concentración de partículas de 59.6% distribuidas en tamaños de malla desde 106 hasta 75 μm y menores (Fondo); la mayor retención se encontró en la malla 75 μm , con un 34.5% para guandul (Tabla 2.).

Tabla 2. Caracterización granulométrica de las harinas de *C. moschata* (ahuyama) y *C. cajan* (guandul).

Tamiz		Ahuyama (%)	Guandul (%)
(No.)°	Malla (μm)		
30	600	2.5	7.2
40	425	4.2	7.4
50	300	5.4	8.0
60	250	6.2	7.6
80	180	7.9	6.5
100	150	8.2	3.8
140	106	20.0	15.0
200	75	30.5	34.5
Fondo		19.60	15.1
Total		129.70	100.0

Propiedades fisicoquímicas y funcionales de las harinas

El pH y la humedad presentaron valores adecuados para la estabilidad de las harinas durante el almacenamiento. En la harina de guandul se destacaron la proteína (17.9 g/100g) y la fibra (6.9 g/100g) y en la harina de ahuyama el contenido de vitamina A (16068.8 $\mu\text{g}/100\text{g}$) (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica y funcional de las harinas de *C. moschata* (ahuyama) y *C. cajan* (guandul).

Característica	Ahuyama (g/100g)	Guandul (g/100g)
pH	6.03 \pm 0.12	6.57 \pm 0.15
Proteína	0.8 \pm 0.98	17.9 \pm 0.55
Grasa cruda	0.18 \pm 0.66	1.02 \pm 0.20
Fibra total	2.0 \pm 0.15	6.9 \pm 0.45
Carbohidratos	74.1 \pm 0.24	58.76 \pm 0.72
Humedad	12.0 \pm 0.16	12.1 \pm 0.69
Cenizas	10.92 \pm 0.32	3.32 \pm 0.83
Vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	16068.8	ND
CAA (g/g)	4.13 \pm 0.12	1.33 \pm 0.01
CAG (g/g)	1.24 \pm 0.01	0.97 \pm 0.03
CFE (g/g)	12.17 \pm 0.51	25.50 \pm 0.50

Capacidad de absorción de agua (CAA), capacidad de absorción de aceite (CAG), capacidad de formación de espuma (CFE). No determinado (ND).

Perfil de aminoácidos de la harina de guandul

El perfil de aminoácidos presentes en la proteína de la harina de guandul se incluye en la Tabla 4. En total fueron identificados 15 aminoácidos de los cuales 10 son esenciales, con contenido total de aminoácidos de 49.19 g/100 g de proteína; entre ellos sobresale el contenido de Lisina (8.48 g/100 g),

Tabla 4. Contenido de aminoácidos (g/100 g de proteína) en harinas de grano de *Cajanus cajan*.

Aminoácidos	Contenido (g/100 g)
Ácido aspártico	9.1
Ácido glutámico	21.46
Alanina	5.9
Arginina*	3.47
Fenilalanina*	9.96
Glicina	4.53
Histidina*	4.08
Lisina*	8.48
Isoleucina*	2.07
Metionina*	1.5
Leucina*	7.15
Serina	4.64
Tirosina*	4.26
Treonina*	3.04
Valina*	5.18
Total (aminoácidos esenciales*)	49.19

* Análisis realizados por duplicado

Formulación de harinas compuestas

Las proporciones de harina para formulaciones compuestas necesarias para cubrir los requerimientos por porción de 10 g de proteína, 500 UI de vitamina A, y 10 g de proteína y 1000UI de vitamina A se incluyen en la Tabla 5. Los porcentajes de aporte de harina de guandul se establecieron entre 81.78 y 74.95 y los de harina de ahuyama entre 18.22 y 25.05, para alcanzar los valores establecidos en dietas de nutrientes tanto para niños mayores de 4 años como para adultos (Ministerio de la protección social, 2011).

Caracterización del valor nutritivo

La caracterización nutritiva de los productos elaborados con estas harinas mostró que el contenido de proteína (13 g) en arepa fue diferente ($P < 0.05$) cuando se comparó con los valores encontrados en la bebida y en el pan.

Tabla 5. Contenido de proteína y vitamina A de harinas compuestas a partir de ahuyama (*C. moschata*) y guandul (*Cajanus cajan*).

Ingrediente	Tipo de harina	
	Compuesta alta en proteína y en vitamina A	Compuesta buena fuente de proteína y vitamina A
Harina de guandul (%)	81.78	74.95
Harina de ahuyama (%)	18.22	25.05
Relación guandul/ahuyama	2.25/0.5	1.5/0.5

Los contenidos de vitamina A fueron igualmente diferentes entre los tres productos evaluados ($P < 0.05$) alcanzando su mayor valor en el producto arepa (1054.4 UI) (Tabla 6).

Tabla 6. Valor nutricional por porción de los productos obtenidos a partir de ahuyama (*C. moschata*) y guandul (*Cajanus cajan*).

Compuesto	Producto		
	Bebida alta en proteína y vitamina A (porción 250 g)	Arepa alta en proteína y vitamina A (porción 100 g)	Pan buena fuente de proteína y vitamina A (porción 100 g)
Relación guandul/ahuyama	2.25/0.5	2.25/0.5	1.5/0.5
Proteína (g)	10.1±0.32	13.0±0.66a*	10.5±0.71
Grasa bruta (g)	0.6±0.45	1.8±0.43a	0.6±0.30
Carbohidratos (g)	72.0±0.63	65.5±0.86	75.0±0.29a
Calorías (kcal)	333.9±0.72	329.7±0.61	347.2±0.85a
Vitamina A (en UI)	500.0±0.25a	1054.4±0.35ab	302.0±0.91

*Medias con letras diferentes en una misma fila muestran diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

5-10g proteína/porción, 500-1000UI Vit. A/porción; Res. 333 de 2011, niños mayores de 4 años y adultos.

Evaluación sensorial

La prueba sensorial de los productos mostró que el producto bebida rica en proteína y vitamina A presentó los mejores resultados de aceptabilidad (Figuras 2, 3 y 4).

Discusión

La ahuyama (*C. moschata*) presentó mejores características de secado cuando se utilizó geometría de láminas. Estas matrices una vez deshidratadas se caracterizan por ser medianamente higroscópicas, por tanto es necesario almacenarlas en condiciones de humedad menores que 65% a temperatura ambiente (Medina et al., 2016). De acuerdo con estudios previos (García-Pacheco et al., 2016), el proceso de secado a 68 °C empleando láminas de bajo espesor (Figura 1.) vs. procesos de mayor

intensidad térmica o con geometrías distintas, disminuye el tiempo de secado y mejora la retención de atributos de calidad y compuestos funcionales, en este caso, provitamina A.

El 65.6% de las harinas se encuentra en tamaños de partículas entre 75 μm y 150 μm , presentando 30.5% de retención en 75 μm para la harina de ahuyama y 34.5% para la harina de guandul (Tabla 2). Estos porcentajes son similares a los encontrados por Castillo-Gómez et al. (2016) quienes obtuvieron valores de 30.97% con malla 63 μm y 38.56% con malla 71 μm , para harinas de ahuyama y guandul, respectivamente. Tamaños de partícula como los encontrados en el presente estudio (75 - 150 μm) pueden ser empleados para la elaboración de productos instantáneos, donde el comportamiento de la capacidad de absorción de agua (CAA) es mayor; tamaños de partícula > 355 μm pueden ser utilizados para la elaboración de productos de panificación (Mabel y Brayand, 2019).

La harina de ahuyama sobresalió por su alto contenido de ceniza (10.92 g/100 g) (Tabla 3), que se considera elevado cuando se compara con los resultados de García et al. (2012) (6.52 g/100 g) y Umaña et al. (2012) (3.67 g/100 g). La harina de guandul presentó un alto contenido de proteína (17.9 g/100 g), un valor similar al encontrado por Miquilena e Higuera (2012) (18.22%) para este producto, aunque menor que el encontrado por estos mismos autores para harinas de frijol blanco (22.50 g/100 g) y frijol negro (21.21 g/100 g). El contenido de fibra de la harina de guandul (6.9 g/100 g) fue alto en comparación con otras leguminosas como el *P. lunatus* (4.3 g/100 g) y similar al de *P. vulgaris* (8.3 g/100 g) encontrados por García-Pacheco et al. (2019).

Por sus características funcionales (Tabla 3) ambos tipos de harinas presentaron buenos parámetros para CAA y CAG (capacidad de absorción de aceite), principalmente la harina de ahuyama con CAA de 4.13 vs. CAG con 1.24 (g/g de muestra). Estos valores indican un buen parámetro del producto deshidratado, especialmente una elevada capacidad de rehidratación, útil para la elaboración de productos instantáneos (García-Pacheco et al., 2016). La harina de guandul presenta buenas características para formar emulsiones en fase líquida, lo que favorece las características de estabilidad de la bebida (Aguilera et al., 2011). Las harinas con estas características son muy utilizadas para la elaboración de productos de panificación y repostería (García-Pacheco et al., 2016) debido a los valores de CFE (25.5%) (Tabla 3) que fueron similares a los obtenidos por Miquilena et al. (2016) y mayores a los encontrados por García et al. (2012) (18.44%). Las características funcionales de CAA en harina

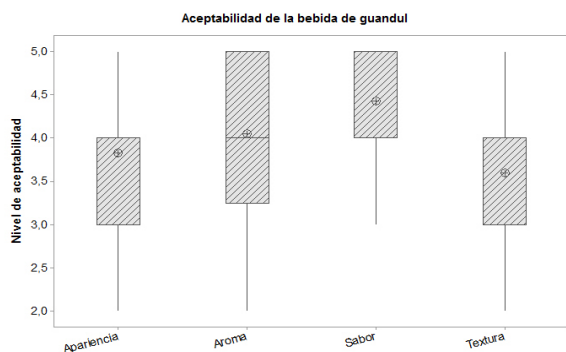


Figura 2. Aceptabilidad de la bebida compuesta a partir de ahuyama (*C. moschata*) y guandul (*C. cajan*) alta en proteína y vitamina A.

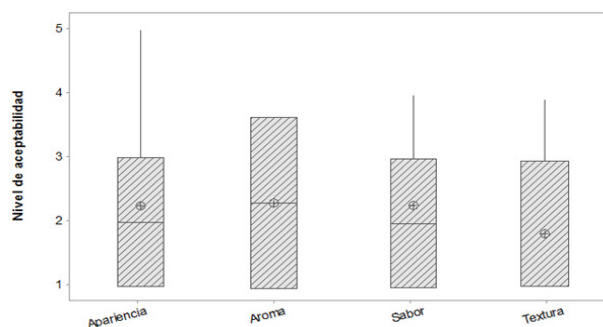


Figura 3. Aceptabilidad de arepa de harinas compuestas a partir de ahuyama (*C. moschata*) y guandul (*C. cajan*) alta en proteína y vitamina A.

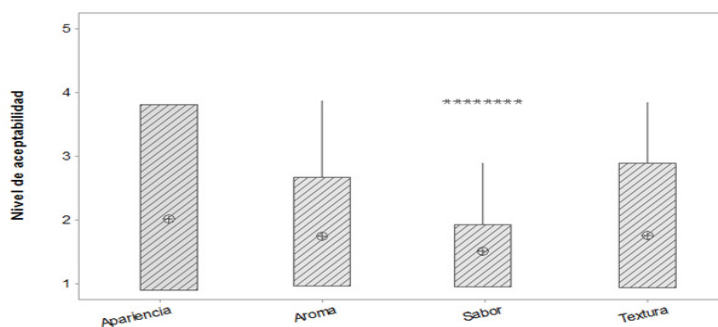


Figura 4. Aceptabilidad de pan de harinas compuestas a partir de ahuyama (*C. moschata*) y guandul (*C. cajan*) buena fuente de proteína y alto en vitamina A.

de ahuyama y CFE en la harina de guandul favorecieron la aceptabilidad de la bebida alta en proteína y vitamina A (Figura 2.).

La proteína en ambos casos es de alto valor nutritivo, gracias a los 10 aminoácidos esenciales identificados (Tabla 4), con un contenido total de 49.19 g/100 g, valor superior al encontrado por Miquelina (41.02 g/100 g) y a los encontrados en harina de soya y frijol (Miquelina e Higuera, 2012). Es necesario señalar los contenidos de fenilalanina (9.96 g/100 g), lisina (8.48 g/100 g) y leucina (7.15 g/100 g) con valores suficientes para cubrir 10% de los requerimientos diarios de aminoácidos para niños entre 6 meses y 3 años de edad, y de 12.7% para adolescentes y adultos, según los requerimientos establecidos por la FAO (2013). El contenido de lisina es de particular interés, debido a su importancia nutritiva y sus funciones en los procesos de crecimiento y desarrollo en infantes y al hecho ser un aminoácido limitante en las proteínas de origen vegetal (Martínez y Martínez, 2006). El contenido de lisina por cada 100 g de proteína superó el requerimiento diario (30 mg/kg peso corporal) (Miquelina y Higuera, 2012).

El aporte nutricional de los productos (Tabla 6.) suple los requerimientos para proteína y vitamina A, establecidos en la Resolución 333 de 2011. Los productos bebida y arepa presentaron contenidos superiores a 10 g de proteína y 500 UI de vitamina A por porción (20% del requerimiento), con lo cual ambos alcanzaron la calificación 'alta'. Por su parte, el producto pan con 10 g de proteína y 302 UI de vitamina A (10% del requerimiento) fue calificado como 'buena fuente'.

Los tratamientos térmicos durante la elaboración de los productos afectaron de forma negativa el contenido de vitamina A, pasando de 8390 UI/100 g a 1054.4 UI/100 g en arepa, 500 UI/100 g en la bebida y 302 UI/100 g en pan (Tabla 6.), equivalentes a una pérdida de 73.8% y 80%, respectivamente. Los carotenoides contenidos en la harina de ahuyama son susceptibles a degradaciones por la severidad y la prolongación del tratamiento térmico al que fueron sometidos (García-Pacheco et al., 2016); en este caso, el pan fue elaborado a 250 °C por 30 min, condiciones en las que alcanzó la mayor pérdida de vitamina A.

Las pruebas sensoriales mostraron que el producto bebida rica en proteína y vitamina A presentó los mejores resultados de aceptabilidad (sabor y aroma), con rangos entre 3.5 y 5 (Figura 2), similares a los encontrados por Pérez y Granito (2015) para una bebida con sabor a chocolate de *C. cajan* y por Valencia et al. (2015) para una bebida a base de harina de ahuyama y lactosuero. La aceptabilidad de los productos arepa rica en proteína y vitamina A, y pan buena fuente de proteína y rico en vitamina A, obtuvieron calificaciones inferiores a 3 puntos, lo cual se asoció con el grado de cocción y horneado de la mezcla de la harina compuesta con el resto de ingredientes, en el cual los atributos de sabor y aroma presentaron mayor nivel de concentración, generando un grado de insatisfacción al momento de consumir el producto.

Con estos resultados la harina compuesta correspondiente a la formulación alta en proteína y vitamina A (Tabla 5) es una alternativa para la elaboración de bebidas ricas en estos nutrientes para la población colombiana, ya que cumple con todos los requerimientos de la legislación.

Conclusiones

Es posible la obtención y formulación de harinas compuestas a partir de *C. moschata* y *C. cajan*, que cubran los requerimientos diarios de proteína y vitamina A, tanto en niños mayores de 4 años como en adultos. Estas harinas pueden ser utilizadas para la elaboración de bebidas tipo coladas o refrescos, a diferencia de los productos de panadería y bollería que presentaron menor aceptabilidad. Con estos resultados, la harina compuesta correspondiente a la formulación alta en proteína y vitamina A es una alternativa para la elaboración de bebidas ricas en estos nutrientes con destino a la población, ya que cumple con todos los requerimientos de la legislación colombiana.

Referencias

Aguilera, Y.; Estrella, I.; Benitez, V.; Esteban, R. M.; Martín-Cabrejas, M. A. 2011. Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44(3), 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.004>

AOAC. 2012. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>

Castillo, G.; Villar, J.; Montano, R.; Martínez, C.; Pérez, F.; Albacete, A.; Sánchez, J. 2011. Cuantificación por HPLC del contenido de aminoácidos presentes en el FITOMAS -E. *Rev. ICIDCA*, 45(1), 64-67. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223122251008>

Castillo-Gómez, C.; Narváez-Solarte, W.; Hahn-Von-Hessberg, C. M. 2016. Agromorfología y usos del *Cajanus cajan* L. Millsp. (Fabaceae). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas*, 20 (1), 52-62. <http://dx.doi.org/10.17151/bccm.2016.20.1.5>

De Moura, F.; Miloff, A.; Boy, E. 2015. Retention of Provitamin A Carotenoids in Staple Crops Targeted for Biofortification in Africa: Cassava, Maize, and Sweet Potato. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 55(9),1246-1269. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724477>

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación 2005. *Políticas de seguridad alimentaria en los países de la comunidad Andina*. Santiago, Chile. 197 p. http://www.comunidadandina.org/staticfiles/201161185212seguridad_alimentaria.pdf

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. 2013. *Dietary protein quality evaluation in human nutrition*. FAO Food and nutrition paper. Report of an FAO Expert Consultation. Rome. 76 p. <http://www.fao.org/3/a-i3124e.pdf>

FAO; FIDA; OMS; PMA; UNICEF. 2017. *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia en aras de la paz y la seguridad alimentaria*. Roma. FAO.144 p. <http://www.fao.org/3/a-i7695s.pdf>

García, O.; Aiello-Mazzarri, C.; Peña-Chirino, M. C.; Rúa-Ramírez, J. L.; Acevedo-Pons, I del C. 2012. Caracterización físico-química y propiedades funcionales de la harina obtenida de granos de quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) sometidos a diferentes procesamientos. *Revista Científica UDO Agrícola*,12(4), 919-928. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg12105>

García-Pacheco, Y. E.; Prieto, M.; Fuenmayor, C. 2016. Cinética, modelación y pérdidas de carotenoides para el secado de ahuyama (*Cucurbita moschata*) en cubos. *Agronomía Colombiana*. 32 (1Supl.), S57-S576. https://www.researchgate.net/publication/313988330_Cinetica_modelacion_y_perdidas_de_carotenoides_para_el_secado_de_ahuyama_Cucurbita_moschata_en_cubos

García-Pacheco, Y.; Cabrera Mercado, D.; Ballestas Santos, J.; Campo Arrieta, M. 2019. Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las propiedades tecfuncionales de la harina de frijol blanco (*Phaseolus lunatus* L.) y la determinación de su potencial uso agroalimentario. *INGE CUC*.15(2),132-142. <https://doi.org/10.17981/ingecuc.15.2.2019.13>


Guzmán, N. M. J. 2017. Causas que Conllevan a una Inseguridad Alimentaria. *Memorias de Congresos UTP*, 186-193. <http://revistas.utp.ac.pa/index.php/memoutp/article/view/1492/>

Jaeger, L. M. J.; Barros, P.; de Oliveira, R. L.; Pacheco, S.; Fernandes, P. H.; Viana, J. L.; Ramalho, S. R. 2012. Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47(2), 337-340. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.07.040>

- Lim, J. 2011. Hedonic scaling: A review of methods and theory. *Food Quality and Preference*, 22(8), 733–747. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2011.05.008>
- Mabel, L. M. S.; Brayand, Z. O. K. 2019. Influencia de la madurez y tamaño de partícula de harina de la cascara de plátano dominico hartón (*Musa AAB Simmons*) en la calidad de pan integral. Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Santa. <http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/3301/49002.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martínez, O.; Martínez, E. 2006. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21(Supl. 2), 1–14. <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v21s2/original1.pdf>
- Medina S.; Martínez O. y Hernández M. Efecto del aireado en láminas de mango (*Mangifera indiana L*) y ahuyama (*Cucubita moschata Duch*). *Rev. Agron. Col.* 2016, vol 34(1), 553-556. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58354>
- Miquilena, E.; Higuera, A. 2012. Evaluación del contenido de proteína, minerales y perfil de aminoácidos en harinas de *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata* y *Vigna radiata* para su uso en la alimentación humana. *Rev. Científica UDO Agrícola*. 12(3), 730–740. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4690191>
- Miquilena, E.; Higuera, A. y Rodríguez, B. 2016. Evaluación de propiedades funcionales de cuatro harinas de semillas de leguminosas comestibles cultivadas en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 33, 58–75. <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/27193/27815>
- Ministerio de la protección social. 2011. Resolución 333 de 2011. Diario Oficial No. 47.984 de 15 de febrero de 2011. http://normograma.invima.gov.co/docs/resolucion_minproteccion_0333_2011.htm
- Ministerio de Salud y Protección Social. 2015. Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN). <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/epidemiologia/Paginas/encuesta-nacional-de-situacion-nutricional-ensin.aspx>
- Ministerio de Salud. 2016. Desnutrición infantil en Colombia: Marco de referencia. 50p. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/AS/papeles-salud-n3.pdf>
- Navarro, C.; Restrepo, D.; Pérez, J. 2014. El guandul (*Cajanus cajan*) una alternativa en la industria de los alimentos. *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 197-206. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n2/v12n2a22.pdf>
- Osorio, A. M.; Romero, G. A.; Bonilla, H.; Aguado, L. F. 2018. Socioeconomic context of the community and chronic child malnutrition in Colombia. *Revista de Saúde Pública*, 52,73, 1–12. <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000394>
- Pérez, S.; Granito, M. 2015. Bebida achocolatada alta en proteínas con base en *Cajanus cajan* fermentado y avena. *Anales Venezolanos de Nutrición* 28(1), 1–20. <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2015/1/art-3/>
- Rodríguez, A. Y.; Camacho, J. M.; Baracaldo, C. M. 2016. Estado nutricional, parasitismo intestinal y sus factores de riesgo en una población vulnerable del municipio de Iza (Boyacá), Colombia año 2013. *Revista chilena de nutrición*, 43 (1), 45-53. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000100007>
- Umaña, J.; Álvarez, C.; Lopera, S. M.; Gallardo, C. 2012. Caracterización de harinas alternativas de origen vegetal con potencial aplicación en la formulación de alimentos libres de gluten. *Revista Alimentos Hoy*. 22(29), 33-46. www.alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/download/230/223
- Valencia, A.; Acurio, L.; Pérez, L.; Salazar, D.; Tamayo, V. 2015. Formulación y caracterización de bebidas nutricionales con base a zapallo y lactosuero, enriquecidas con avena y maracuyá. *Enfoque UTE*, 6(4):55–66. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v6n4.78>

Calidad y protección microbiológica de huevos de mesa por aplicación ultrasónica de agua electrolizada ácida y quitosano

Quality and microbiological protection of table eggs by ultrasonic application of acidic electrolyzed water and chitosan

Héctor Cabanillas-Beltrán ¹, Ramsés R. González-Estrada ², Porfirio Gutiérrez-Martínez ³,
Silvia María. Hernández-López ⁴

¹ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit, México. ✉ cabh54@yahoo.com.mx

² Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit, México. ✉ rglezeestrada@gmail.com

³ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit, México. ✉ pgutierrez@ittec.edu.mx

⁴ Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura “Amado Nervo”, Tepic, Nayarit 63155, México. ✉ silviahdezlopez@hotmail.com

Rec.: 23-01-2019 Acep.: 27-06-2019

Abstract

Ultrasonic nebulization was used as a novel method of chitosan (CH) and acidic electrolyzed water (AEW) application on table eggs; effects on preservation, quality and antimicrobial properties were investigated. The effect of the application of CH and AEW alone or in combination on eggs quality was evaluated in terms of weight loss, shell thickness, yolk colour, Haugh units and shell strength. Additionally, the application of CH and AEW as antimicrobial agent was investigated in order to evaluate their efficacy against *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* (ATCC 25922). A negative effect was observed by the sole application of AEW on eggshell thickness and strength. Conversely, the combination of AEW and CH improve eggshell strength, as well as avoid water losses. The use of CH alone stable Yolk colour values and Haugh units compared to control eggs during the storage time. The combination of AEW and CH reduced the antimicrobial activity. However, the sole application of CH or EAW was effective depending the type of inoculation and the strain evaluated.

Key words: Antimicrobial; Biopolymer; Fogging; Sanitizer

Abstract

La nebulización ultrasónica es un método novedoso para aplicar quitosano (CH) y agua electrolizada ácida (AEW) a huevos de mesa con el fin preservar la calidad y las propiedades antimicrobianas. En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de CH y AEW) solos o en combinación, sobre la calidad de huevos considerando la pérdida de peso, el grosor y resistencia de la cascara, el color de yema, y las unidades Haugh, y sus propiedades cuando se utilizan como agentes antimicrobianos, especialmente contra *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Los resultados mostraron un efecto negativo por la aplicación única de AEW sobre el grosor y la resistencia de la cascara; en contraste, la combinación de AEW y CH mejoró la resistencia y evitó la pérdida de agua. La aplicación de solo CH estabilizó el color de yema y las unidades Haugh, en comparación con los huevos control durante el tiempo de almacenamiento. La aplicación combinada de AEW y CH redujo la actividad antimicrobiana. No obstante, cuando se aplicó solo uno de ellos, su efectividad estuvo en función del tipo de inoculación y de la bacteria evaluada.

Palabras clave: Antimicrobiano; Biopolímero; Desinfectante; Nebulización.

Introduction

Mexico is a large producer and consumer of table eggs, with an annual production of 2.731.891 tons (Rodríguez *et al.*, 2016). However, for industrial storage of eggs, quality can be compromised by several problems, including weight loss, internal deterioration and microbial contamination (Suresh *et al.*, 2015), while foodborne diseases are a major public health concern worldwide (Crim *et al.*, 2014). *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* are the most common foodborne pathogens transmitted to humans by consumption of contaminated eggs due to poor hygienic practices at eggs farms (Hajieh *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2014). Currently the egg industry use sanitizing agents in order to decontaminate surfaces of shell eggs prior to packaging, although, this practice has the major disadvantage of causing potential damage to the egg cuticle, which may favour contamination with bacteria and consequently moisture loss. In this sense, ultrasonic nebulization was used as a novel method of chitosan (CH) and acidic electrolyzed water (AEW) application on table eggs and its effects on preserving eggs quality and antimicrobial properties were investigated.

Nebulization generally operates at frequencies above 1 MHz; when such an acoustic field is applied to a shallow liquid film, a series of interfacial waves are generated at the surface. Small droplets pinch off from these waves, generating a very fine mist or aerosol (Kentish and Feng, 2014). The efficacy of chitosan has been reported on table eggs, preserving their internal quality stored at room conditions of 32 °C and 60–70% relative humidity. Chitosan is a copolymer consisting of β -(1–4)-2-acetamido-D-glucose and β -(1–4)-2-amino-D-glucose units with the latter usually exceeding 60%. This biopolymer is biocompatible, biodegradable, nontoxic, and possesses film forming property for use as edible coatings as well as strong antimicrobial activity against foodborne pathogens (Elsabee and Abdou, 2013). AEW has been evaluated in controlling microbial spoilage contamination on fruits and vegetables with good results (Hao *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2015). The use of AEW represents an advantage because there are no chemicals to purchase or store and has minimal impact on the environment (Feliziani *et al.*, 2016). Therefore, effective egg surface disinfection is critical to reduce pathogens on eggs and potentially control egg-borne disease outbreaks. To our knowledge, no research has been reported on the application of AEW and CH on eggs by ultrasonic nebulization. The objectives of this work were evaluating the impact of chitosan and AEW application on eggs quality and to determine their antimicrobial potential.

Materials and methods

Materials. 300 white-shell eggs, faeces-free (average weight 60 g) were purchased at a local grocery store in Tepic, Mexico. Shell eggs without visible cracks (lighting cracks) were sanitized with 70% ethanol to remove debris and microorganisms and immediately used for the experiment. Chitosan-low molecular weight (50-190 kDa, $\geq 75\%$ deacetylation) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). The AEW was generated using a self-developed electrolysis reactor, using 0.1% NaCl solutions as electrolyte.

Bacterial strains and culture conditions. *Salmonella enteritidis* was provided by the Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Nayarit and *E. coli* (ATCC 25922) was purchase on Microbiologics. *E. coli* (ATCC 25922) was culture in MacConkey medium (BD Bioxon, USA) agar at 37 °C (18 h) and *S. enteritidis* on Salmonella-Shigella (BD Bioxon, USA) agar at 37 °C (18 h). The inoculum was prepared using cultures in MacConkey and SS agar Petri dish. The cultures in Petri dishes were scraped using a sterile loop and re-suspended in 100 mL of sterile physiological saline (0.85% NaCl). The inoculum concentration was determined by microscopic counting in a haemocytometer and adjusted to 8 log CFU/mL.

Chitosan (CH). The preparation of the different concentrations of CH was carried out following the methodology proposed by Ghaouth *et al.* (1991). Briefly, 1.0 g of chitosan was dissolved in 100 mL of distilled water with 2 mL of acetic acid at constant agitation for 24 h at room temperature, as stock solution. Then, dilutions were made to adjust the concentrations to 0.1 and 0.5%. Finally, pH of solutions was adjusted to 5.5 using NaOH (1N) and 100 μ L of Tween 80 was added.

Acidic electrolyzed water, AEW. AEW was generated using self-developed electrolysis reactor, containing a membrane electrolytic platinum electrode and using 0.1% sodium chloride (Sigma, USA) solutions as electrolyte. This equipment was operated at 4.5 amperes of direct current and 60-75 V. The AEW was obtained at a rate of 0.5 L/min and collected in polypropylene containers, when stable current and amperage were reached, and used in the experiments. The pH (Model Hanna Instruments, USA) and ORP (HI991003 Woonsocket, RI, USA) were measured, the available chlorine concentration was measured by iodometric method (Seymour, 1983).

Eggs treatments. The nebulization was performed using an ultrasonic aerosol generator (Mist Maker, Model DK12, China), input 120V/36V AC, and disk size 20 mm, that has a

liquid reservoir (2.0 L) for holding the liquid to be fogged and produces a fog of droplets of 5 μm in diameter. The small particles are carried away by the airflow inside the chamber and with a fan the particles were transported into the biosafety hood. Two litters of each treatment were put on the ultrasonic water fogger. The treatments were applied on a biosafety hood Novatech (Model CFLH-90, Mexico) during 1 min. All treatments were applied separately. The ultrasonic nebulization was created at 1.70 MHz and 5.30 L/h. For the evaluation of quality parameters (thickness and strength, yolk colour, Haugh unit) five eggs were used and broken per treatment, 10 eggs were used for weight loss per treatment; these measurements were made every week for three weeks. For microbiological analysis three eggs were used per treatment and evaluations were only made at the end of each treatment.

Eggshell quality: thickness and strength.

Thickness of each eggshell was measured with a micrometre (Mitutoyo, 395-271, USA) at 10 random positions of eggshell. Shell strength measurement was performed using a Texture Analyser (QC-SPA system-TSS, England). Each egg was mounted on a platform and eggshells were subjected to a compression force punctured at the top (small end), the test was carried out with the following conditions: trigger force 5.0 g, test distance 5.0 mm and 2 mm/s of constant speed. The force required to break an eggshell (as kgf) was recorded and expressed as the shell strength of the eggshell.

Weight loss. Ten eggs per treatment were placed in plastic fillers in a chamber at 25°C and 74% relative humidity. All eggs were weighted at specific time intervals and calculated as follows: $\{ \text{initial whole egg weight (g) at day 0} - \text{whole egg weight (g) after storage} / \text{initial whole egg weight (g) at day 0} \times 100 \}$. The weight of whole eggs was measured with a digital balance (QCBi-XT-TSS, England).

Yolk colour. Colour was evaluated using a colorimeter Konika Minolta (CR-400, USA) with 2° standard observers and D_{65} illuminant. The L^* , a^* , and b^* values were taken at 3 random locations on yolk egg. Results were recorded as L^* (lightness), a^* (+ for redness and - for greenness) and b^* (+ for yellowness and - for blueness).

Determination of Haugh unit. The height of the albumen and yolk in each egg was measured with a tripod micrometer (QCM+Range-TSS, England). The Haugh unit was calculated as $100 \log (H - 1.7 \times W^{0.37} + 7.57)$, where H is the albumen height (mm) and W is the weight (g) of egg (11) (Haugh, 1937).

Scanning electron microscope (SEM).

Microstructures of the cross-sectional surface of eggshells were examined by a Scanning Electron Microscope using a MINI-SEM (SNE-3200M, South Korea). Samples (1 × 1 cm) were cut using a sharp razor blade, and mounted on specimen stubs with a double-sided carbon tape. Samples of each treatment were observed, after gold coating, using an accelerating voltage of 10 kV.

Inoculation of egg Shell. The eggs were previously sanitized with ethanol, rubbing gently on its surface, for three seconds. Then, the eggs were spot inoculated with 10 μL of 8.0 log CFU/mL of the strains *S. enteritidis* or *E. coli* and allowed to dry for 15 min in a biosafety hood in order to permit cell attachment. Finally, the treatments were applied, as described above.

Effect of treatments on bacterial viability (before and after inoculation).

Efficacy of treatments before inoculation was performed by first applying the treatments to eggs, leaving the egg to dry 15 min at ambient temperature (25 °C) in a biosafety hood and then exposing treated eggs by inoculating with the bacterial suspension. After inoculation evaluation was done by first exposing eggs by inoculating with the bacterial suspension, leaving the egg to dry 15 min at ambient temperature (25 °C) in a biosafety hood and then applying the treatments to eggs. Individually eggs were placed into sterile stomacher bags (Seward, BA6041/CLR, UK) containing 100 mL of sterile physiological saline (0.85% NaCl), washed and gently rubbed manually for 1 min to remove cells. Serial dilutions were then prepared and a 100- μL sample of appropriate dilutions was spread on MacConkey and SS agar. Survival populations of strains on eggs were counted after incubation for 18 h at 37 °C. 11 tests were carried in triplicate.

Statistical analysis. The experiments were repeated twice. CFU data of bacterial counts were log-transformed prior to ANOVA to improve the homogeneity of variances. Analysis of variance (ANOVA) of data was performed using Statistica version 10. When the data analysis allowed it, differences between means of data were compared by least significant differences (LSD). Differences at $P < 0.05$ were considered to be significant.

Results and discussion

Thickness and strength. The effect of the antimicrobial treatments on shell thickness and strength are shown in Figures 1 and 2. Shell thickness and strength are important to preserve moisture loss, mechanical protection, as well as to prevent microbial invasion during

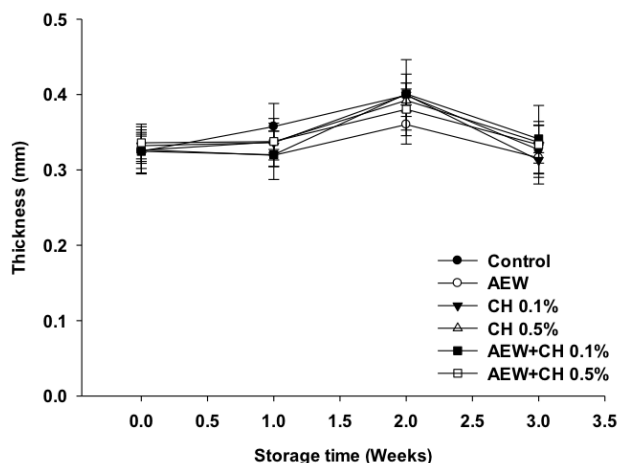


Figure 1. Eggshell thickness during three weeks of storage.

handling. A significant change was observed with the application of AEW on shell strength and thickness ($P < 0.05$) compared to control (Figures 1 and 2). The eggshell is constituted of shell membranes and cuticle layers (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2013). Previously, Bialka *et al.* (2004) reported a partial elimination of the cuticle layer on eggs treated with AEW, however this affectation was not significant to affect the shell strength. The presence of cuticle enhances the mechanical strength of eggshell (Liu *et al.*, 2016). The damage on cuticle can expose the pores and facilitate crack formation, as evidenced by SEM (Figure 3b). The results on eggshell quality also suggest, that the application of AEW by ultrasonic nebulization have a major impact on cuticle damage in compare to its application by immersion, probably the fine mist formed (droplet size $5 \mu\text{m}$) had a major surface contact extending the damage on cuticle. Thickness of eggs treated with CH alone or in combination with AEW was similar to control, conversely a significant eggshell strength ($P < 0.05$) was observed on eggs treated with AEW + CH 0.5%. This could be due to the presence of chitosan coatings, as evidenced by SEM (Figure 3f). In agreement with these results, Suresh *et al.* (2015) reported an increase on eggs shell strength by the application of CH.

Weight lost. The weight loss of eggs increased when stored because of water loss (Figure 4). Control eggs and treated with CH at lowest concentration and AEW (alone) showed more weight loss than eggs treated with CH at 0.5% or combination with AEW. This effect could be due to the degradation of CaCO_3 of eggshell and exposition of pores, as previously reported Suresh *et al.* (2015) and evidenced in their study by SEM. These results are according to eggshell quality evaluation, reporting the loss of integrity of shell

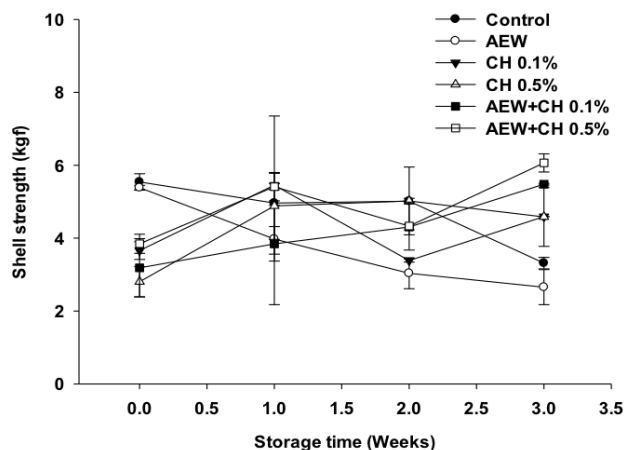


Figure 2. Shell strength of eggs during three weeks of storage.

by the application of AEW. Even when, a coating on shell surface was evidenced by SEM (Figure 3c) by the application of CH (1%), it's not sufficient to avoid water losses, probably by the formation of a thinner coating on shell surface due to the low concentration of CH used. By contrast, the shell of eggs treated with AEW + CH 0.5% showed a smooth surface without the presence of cracks and exposition of pores (Figure 3f), probably due to the presence of thicker coating which contributed to less weight loss. This study shows that CH coating, may offer a protective barrier against transfer of moisture through the eggshell. The effectiveness of coatings to improve water losses on eggs have been previously reported (Suresh *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

Yolk colour. The pigment in egg yolk determines the acceptability of the product by the consumer who prefers yellow-orange egg yolk. Yolk colour is mainly due to the content of yolk carotenoids, which can be degraded by oxidative processes, changing the yolk pigmentation during storage and processing (Nimalaratne *et al.*, 2016). No significant changes were observed on L^* values in all treatments (Figure 5). Eggs treated with the combination of AEW + CH 0.1% a significant increase ($P < 0.05$) on a^* and b^* values were observed. Conversely, a decrease on these values was obtained with the sole application of CH compared to control. The use of CH seems to play an important role in maintain the pigmentation of egg yolk, as previously Bhale *et al.* (2003) reported.

Haugh unit. Haugh units are the primary index of quality in the egg industry. The higher Haugh value, the better the albumen quality of the eggs (Stadelman, 1995). Changes in Haugh units are presented in Figure 6. Generally, the Haugh units decreased with increasing storage time.

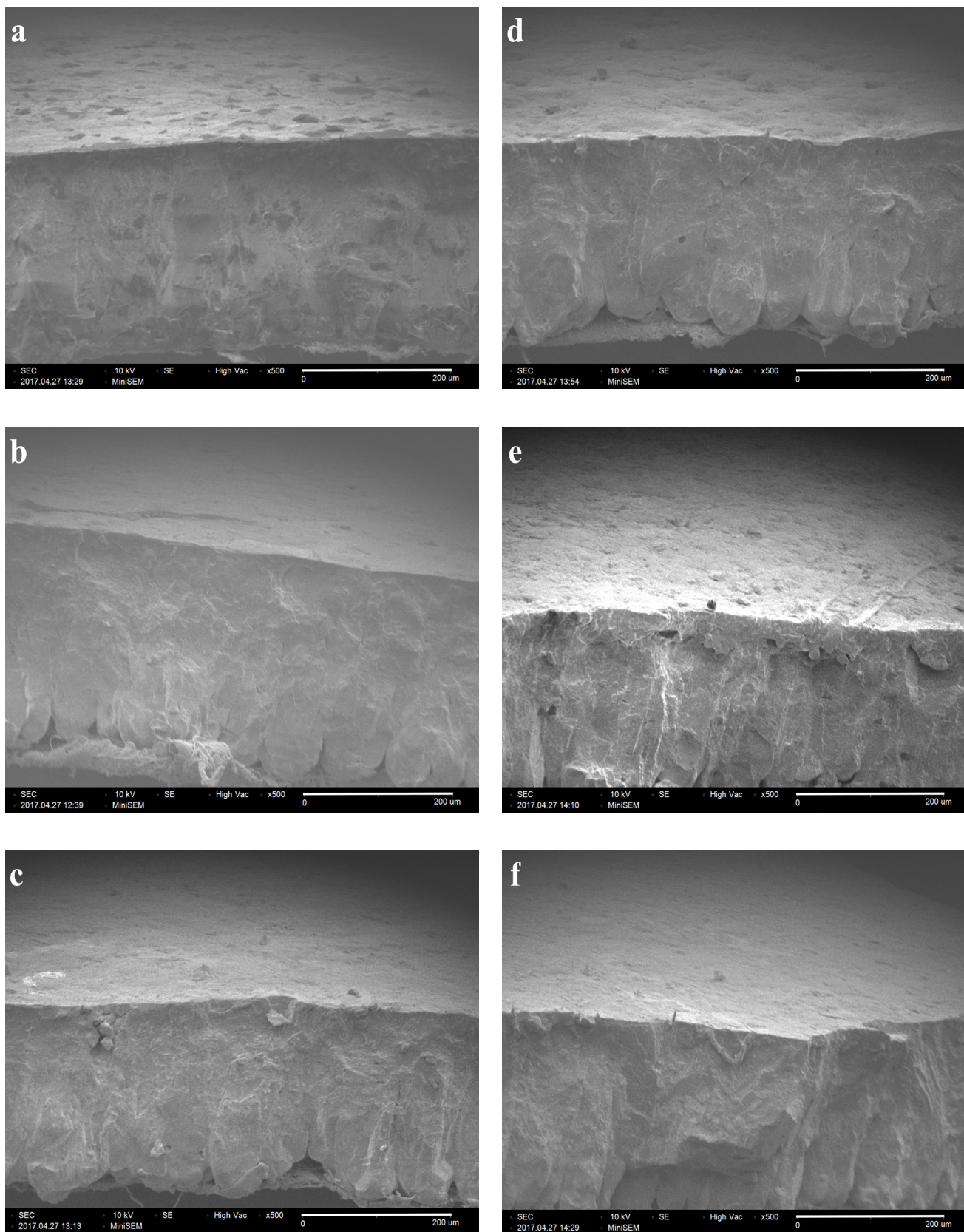


Figure 3. Scanning electron micrographs (SEM) of treatments applied on eggs: (a) Control, (b) AEW, (c) CH 0.1%, (d) CH 0.5%, (e) AEW+CH 0.1% and (f) AEW+CH 0.5%. Magnification of 500x, Bar = 200 μm.

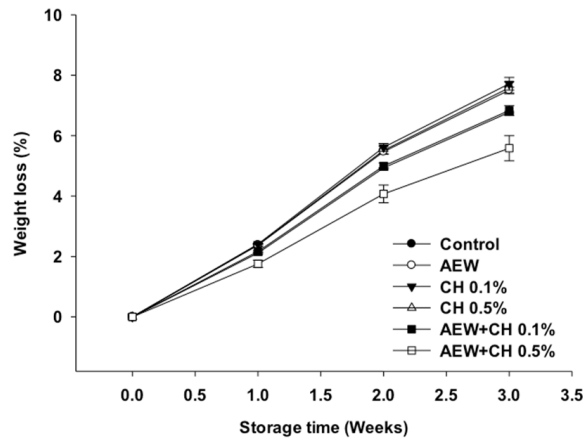


Figure 4. Weight loss of eggs during three weeks of storage.

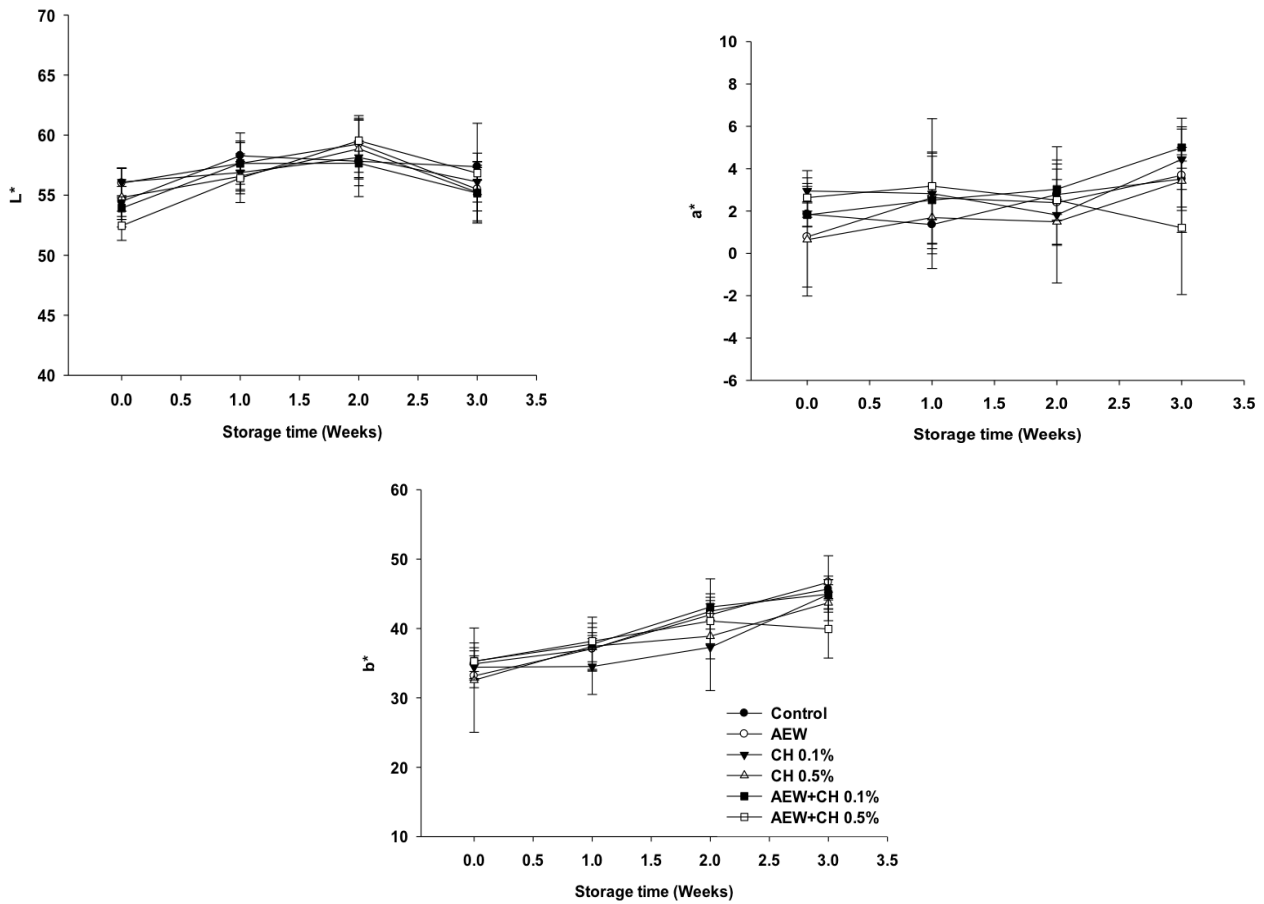


Figure 5. Colour values of yolk eggs during three weeks of storage.

According to Mueller (1959) the albumen quality can be lost mainly to the movement of water from albumen to yolk. Significant differences ($P < 0.05$) were exhibited between control eggs and eggs treated with CH alone after 3 weeks of storage. The concentration of CH plays an important role on maintain the albumen quality, this could be

due to the thickness of the coatings as evidenced on avoid water loss and SEM observations. This means that eggs treated with CH 0.5% (69.7) could preserve the albumen quality for at least three weeks compared to control eggs (61.2), as previously Kim *et al.* (2009) and Suresh *et al.* (2015) reported.

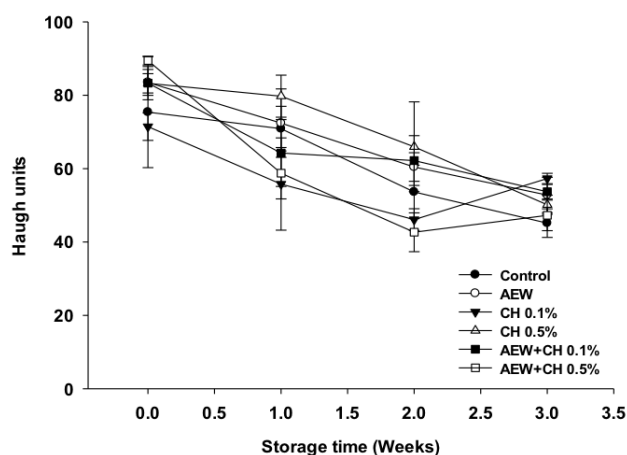


Figure 6. Haugh units during three weeks of storage.

Scanning electron microscope (SEM). The eggshell of control eggs showed a surface porosity (Figure 3a). In contrast, eggshells treated with CH alone or in combination with AEW, the pores were covered by a coating as well as a smoother surface compared to control eggshell was observed (Figures 3c-f). Similar observations have been reported (Suresh *et al.*, 2015). A different morphology in cross-section was observed with all the treatments compared to control. A change in internal morphology by the application of biopolymers as coatings has been previously reported by Xu *et al.* (2016). Figure 3b show the morphology of eggshell treated with AEW, from which obvious cracks could be seen.

Treatment effect on bacterial viability. The results of the efficacy of treatments are shown in Table 1. For eggs inoculated with *S. enteritidis*, significant differences ($P < 0.05$) were found among the treatments on microbial inactivation. AEW was effective on totally reduce *S. enteritidis* after and before inoculation. Conversely, eggs inoculated with *E. coli* and treated with AEW only 2 log CFU/egg (after inoculation) were reduced. Only CH at low concentration (0.1%) was effective

to completely inactivate *E. coli* on eggshell. The bactericidal effect of AEW is attributed to its low pH (2.1-4.5), high oxidation-reduction potential (higher than 1000 mV) and the presence of active oxidizers (Liao *et al.*, 2007). Several mechanisms of action have been proposed for AEW including damage of membranes, decarboxylation of amino acids, reactions with nucleic acids and oxidation of enzymes (Hricova *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2013). Several studies have been reported the effectiveness of AEW on contaminated eggs by *S. enteritidis* and *E. coli* (Cao *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2009; Ni *et al.*, 2014). The antibacterial activity of CH on Gram-negative occurs with the electrostatic interaction between the polycationic structure of CH and the anionic components (phosphate, carboxyl) (Cao *et al.*, 2009) of the microorganism's surface (on lipopolysaccharides) leading the destabilization and function of the outer membrane of microorganism, affecting its permeability with the leakage of the cell constituents, and cell death (Kong *et al.*, 2010). The use of CH as coatings, in order to control microbial spoilage has been reported with good results (Jin *et al.*, 2013; Legendre *et al.*, 2015; Saeed *et al.*, 2017; Suresh *et al.*, 2015). The combination of sanitizing agents is regularly used to increase the efficacy of disinfectant against pathogenic microorganism (Joshi *et al.*, 2013); however, the combination of AEW and CH reduced the bactericidal activity against the pathogens tested. Bactericidal efficacy of CH depends of various factors like: (1) microbial factors (related to microorganisms); (2) intrinsic factors of CH (concentration, molecular weight, positive charge density); (3) physical state of CH (water-soluble or solid state); (4) environmental factors (pH, temperature and reactive time) (Kong *et al.*, 2010). According to our results, the fog as physical state plays an important role on its efficacy. On the other hand, Hricova *et al.* (2008) reported that AEW antibacterial efficacy can be reduced when the sanitizer is in contact with organic materials like CH, as evidenced in this study.

Table 1. Evaluation of the efficacy of treatments on bactericidal activity.

Treatments	Surviving population			
	<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>	
	After inoculation	Before inoculation	After inoculation	Before inoculation
Control	8.04±0.04Ac ^d *	8.03±0.01Ac	8.01±0.05Ad	8.05±0.02Ac
AEW	0.00±0.00Aa	0.00±0.00Aa	6.00±0.00Ab	7.98±0.03Bc
CH 0.1%	0.00±0.00Aa	7.99±0.00Bc	0.00±0.00Aa	0.00±0.00Aa
CH 0.5%	7.21±0.12Bb	0.00±0.00Aa	0.00±0.00Aa	6.43±0.37Bb
AEW+0.1%	8.06±0.0Ad	8.02±0.07Ac	7.80±0.38Ad	8.02±0.02Ac
AEW+0.5%	7.93±0.09Bc	6.20±0.17Ab	7.43±0.04Ac	7.89±0.06Bc

* Data in the same column followed by different lower case letters are significantly different ($P < 0.05$). Data in the same row followed by different capital letter are significantly different ($P < 0.05$).

Conclusion

The application of AEW and CH alone was found to be effective in controlling microbial spoilage by *S. enteritidis* and *E. coli* on table eggs with significant reductions. However, CH resulted more effective to maintain quality parameters compared to AEW. The best application method of sanitizers was ultrasonic nebulization and it can be a smart choice, not only with the advantage in reducing costs and volume of CH applied, besides their efficacy to maintain quality and microbial protection of table eggs.

Acknowledgments

The authors are pleased to acknowledge Matias Chávez-Tapia for technical assistance in quality assessments.

References

- Bhale, S.; No, H.K.; Prinyawiwatkul, W.; Farr, A.; Nadarajah, K.; Meyers, S. 2003. Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of Food Science*, 68(7), 2378-2383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05776.x>
- Bialka, K. L.; Demirci, A.; Knabel, S.; Patterson, P.; Puri, V. 2004. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poultry Science*, 83(12), 2071-2078. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.2071>
- Cao, W.; Zhu, Z. W.; Shi, Z. X.; Wang, C. Y.; Li, B. M. 2009. Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella enteritidis* and its contaminated shell eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (2), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.021>
- Crim, S. M.; Iwamoto, M.; Huang, J. Y.; Griffin, P. M.; Gilliss, D.; Cronquist, A. B.; Cartter, M.; Tobin-D'Angelo, M.; Blythe, D.; Smith, K. 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US sites, 2006–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 63(15),328-32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24739341/>
- Cui, X.; Shang, Y.; Shi, Z.; Xin, H.; Cao, W. 2009. Physicochemical properties and bactericidal efficiency of neutral and acidic electrolyzed water under different storage conditions. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 582-586. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.006>
- Elsabee, M. Z.; Abdou, E. S. 2013. Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4),1819-1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Feliziani, E.; Lichter, A.; Smilanick, J. L.; Ippolito, A. 2016. Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 122,53-69. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.016>
- Ghaouth, A.; Arul, J.; Ponnampalam, R.; Boulet, M. 1991. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15(5), 359-368. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1991.tb00178.x>
- Hajieh, G. S.; Mohammad, J.; Ahad, H.; Tahmineh, N.; Ali, S.; Ebrahim, R. 2017. The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retailers markets by *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in Shahrekord, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4 (4), 249-254. <https://sites.kowsarpub.com/ijm/articles/72434.html>
- Hao, J.; Li, H.; Wan, Y.; Liu, H. 2015. Combined effect of acidic electrolyzed water (AcEW) and alkaline electrolyzed water (ALEW) on the microbial reduction of fresh-cut cilantro. *Food Control*. 50, 699-704. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.027>
- Haugh, R. R. 1937. A new method for determining the quality of an egg. *US Egg Poultry Mag*, 43, 552-555. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10019768224/>
- Hricova, D.; Stephan, R.; Zweifel, C. 2008. Electrolyzed water and its application in the food industry. *Journal of Food Protection*. 71(9), 1934-1947. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.9.1934>
- Jin, T. Z.; Gurtler, J. B.; Li, S. Q. 2013. Development of antimicrobial coatings for improving the microbiological safety and quality of shell eggs. *Journal of Food Protection*. 76(5), 779-785. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-460>
- Joshi, K.; Mahendran, R.; Alagusundaram, K.; Norton, T.; Tiwari, B. 2013. Novel disinfectants for fresh produce. *Trends in Food Science & Technology*, 34(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.008>
- Kentish, S.; H. Feng. 2014. Applications of power ultrasound in food processing. *Annual review of Food Science and Technology*, 5, 263-284. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182537>
- Kim, S. H.; Youn, D. K.; No, H. K.; Choi, S. W.; Prinyawiwatkul, W. 2009. Effects of chitosan coating and storage position on quality and shelf life of eggs. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(7), 1351-1359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01964.x>
- Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Legendre, G.; Vallée-Réhel, K; Linossier, I.; Faÿ, F. 2015. Evaluation of ionically cross-linked chitosan coating aimed at eggs' protection. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(3), 736-743. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12690>
- Liao, L. B.; Chen, W. M.; Xiao, X. M. 2007. The generation and inactivation mechanism of oxidation-reduction potential of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1326-1332. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.004>
- Liu, Y. C.; Chen, T. H.; Wu, Y. C.; Lee, Y. C.; Tan, F. J. 2016. Effects of egg washing and storage temperature on the quality of eggshell cuticle and

- eggs. *Food Chemistry*. 211, 687-693. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.056>
- Mueller, W. J. 1959. Factors affecting the quality loss in egg albumen during storage. *Poultry Science*. 38(4), 843-846. <https://doi.org/10.3382/ps.0380843>
- Ni, L.; Cao, W.; Zheng, W.; Chen, H.; Li, B. 2014. Efficacy of slightly acidic electrolyzed water for reduction of foodborne pathogens and natural microflora on shell eggs. *Food Science and Technology Research*, 20 (1), 93-100. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.93>
- Nimalaratne, C.; Schieber, A.; Wu, J. 2016. Effects of storage and cooking on the antioxidant capacity of laying hen eggs. *Food Chemistry*, 194, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.116>
- Pinto, L.; Baruzzi, F.; Ippolito, A. 2015. Recent advances to control spoilage microorganisms in washing water of fruits and vegetables: the use of electrolyzed water. *Acta Horti*, 1144, 379-384. https://www.ishs.org/ishs-article/1144_72
- Ramos, B.; Miller, F.; Brandão, T. R.; Teixeira, P.; Silva, C. L. 2013. Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Rodríguez, Y. Y. M.; Paz, J. D. J. B.; Coronado, J. J. A.; Sangerman-Jarquín, D. M. and Gómez, J. N. M. 2016. El mercado de huevo en México: tendencia hacia la diferenciación en su consumo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(6), 1455-1466. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000601455
- Rodríguez-Navarro, A. B.; Domínguez-Gasca, N.; Muñoz, A.; Ortega-Huertas, M. 2013. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*. 92 (11), 3026-3035. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03230>
- Saeed, F.; Javaid, A.; Ahmed, N.; Nadeem, M. T.; Arshad, M. S.; Imran, A.; Sohaib, M.; Khan, A. U. 2017. Influence of Edible Coating Techniques on Quality Characteristics of Eggs. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(2), e12815. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12815>
- Seymour, S. 1983. *Disinfection, sterilization and preservation*. Lea & Febiger. University of Michigan. USA. 1053 pp.
- Stadelman, W. 1995. *Quality identification of shell eggs*. 29 p. In: *Egg Science and Technology*. Taylor & Francis. USA. 590 p. <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780203758878/chapters/10.1201/9780203758878-3>
- Suresh, P.; Raj, K. R.; Nidheesh, T.; Pal, G. K.; Sakhare, P. 2015. Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of table eggs under tropical room conditions. *Journal of Food Science and Technology*. 52(10), 6345-6354. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13197-015-1721-7>
- Wang, B.; Huang, X.; Ma, M.; Shi, Q.; Cai, Z. 2014. A simple quantum dot-based fluoroimmunoassay method for selective capturing and rapid detection of *Salmonella* Enteritidis on eggs. *Food Control*. 35 (1), 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.025>
- Xu, L.; Zhang, H.; Lv, X.; Chi, Y.; Wu, Y.; Shao, H. 2016. Internal quality of coated eggs with soy protein isolate and montmorillonite: Effects of storage conditions. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1-14. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1224896>

Evaluation of impacts of potato crops and livestock farming in Neotropical high Andean Páramo soils, Colombia

Evaluación de impactos del cultivo de papa y la explotación ganadera en suelos de Páramo Neotropical alto Andino, Colombia

María-Alejandra Farfán ¹; Sandra-Milena Forero ²; Lizeth-Manuela Avellaneda-Torres ³

¹ Universidad Libre. ✉ mariaa-farfana@unilibre.edu.co

² Universidad Libre. ✉ sandram-forerog@unilibre.edu.co

³ Universidad Libre. ✉ lizethm.avellanedat@unilibre.edu.co; ✉ lmavellanedat@unal.edu.co

Rec.: 11-09-2019 Acep.:17-02-2020

Resumen

Los Páramos son ecosistemas neotropicales resultantes de formaciones insulares dominadas por gramíneas en matorral y matorrales que se encuentran por encima de la línea de bosque continuo y por debajo de la línea de nieves perpetuas de las cumbres más altas de los Andes Septentrionales. El objetivo de esta investigación fue evaluar las hipótesis existentes sobre el impacto que el cultivo de papa y la explotación ganadera tienen en la calidad de los suelos de Páramo. Para ello, se realizaron muestreos en tres usos del suelo a dos alturas diferentes: Páramo con la menor intervención posible y Páramo donde se realizan las actividades de cultivo de papa y explotación ganadera, en los que se determinaron las propiedades fisicoquímicas, abundancia de grupos funcionales de microorganismos (fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato, celulolíticos) y actividades enzimáticas (ureasa, proteasa, β -glucosidasa, fosfatasa ácida y alcalina). La humedad gravimétrica, la densidad aparente, el carbono orgánico, la capacidad de intercambio catiónico, la ureasa, la fosfatasa ácida y la β -glucosidasa mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), lo cual indica que la calidad del suelo expuesto a actividades agrícolas y ganaderas está siendo modificada. Mientras que, para los microorganismos, la hipótesis no se confirmó, no obstante, existen señales de advertencia para el futuro en el caso de continuar con estas prácticas.

Palabras clave: Actividad enzimática; Bacterias fijadoras de nitrógeno; Bacterias solubilizadoras de fosfatos; Microorganismos celulolíticos; Propiedades fisicoquímicas del suelo

Abstract

Páramos are Neotropical ecosystems that result from insular formations dominated by tufted hair grasses and shrubs, and are located above the continuous forest track and below the perpetual snowline of the highest peaks in the Northern Andes. The aim of this research was to check the reliability of the hypothesis that the potato cultivation and livestock farming activities modify the quality of Páramo soils. For this, soil samples were taken from soil used with three different purposes at two different heights: Páramo with the least possible intervention, and Páramo where the activities of potato cropping and livestock farming were carried out; from these, and that have been determined to have physicochemical properties, abundance of functional groups of microorganisms (nitrogen-fixing, phosphate solubilizers, cellulolytic microorganisms), and enzymatic activities (urease, protease, β -glucosidase, acid, and alkaline phosphatase). The gravimetric humidity, apparent density, organic carbon, cation exchange capacity, urease, acid phosphatase, and β -glucosidase showed statistically significant differences ($P < 0.05$), indicating that there is a change in the quality of the soil that is exposed to agricultural activities. As for microorganisms the hypothesis was not confirmed; there are warning signs for the future in the case of continuing with these practices, but there are no significant differences.

Key words: Cellulolytic microorganisms; Enzymatic activities; Nitrogen-fixing bacteria; Phosphate solubilizing bacteria; Soil physicochemical properties

Introduction

Páramos constitute one of the most important and unique ecosystems in the world, but also one of the least known (Hofstede, 2001). They are of great importance for providing drinking water to a large proportion of the population, store and intercept water, harbour endemic flora and fauna, and provide environmental services such as atmospheric carbon mitigation spaces (Vargas et al., 2012). The Páramos top the list of biodiversity hotspots around the world (Myers et al., 2000); as approximately 6.7% of the endemic plants in the world and 5.7% of global vertebrate species are observed throughout the mountainous gradient (Llambi et al., 2012). This is a key point since biodiversity hotspots have lost about 86% of their original habitat and are considered to be significantly threatened by extinctions that may be generated by global warming (Carrillo et al., 2019).

The greatest impact in the Northern Andean Páramos comes from livestock, agriculture, and vegetation burning that is associated with these activities (Hofstede, 2001). Today, at least 60% of the Páramos are subject to continuous use (Hofstede, 2001), for example, 40% of the Páramos in Ecuador were turned into crops and other 30% work as moderate grazing areas (Hofstede, 2001). In Colombia, 10% of what was Páramo is use for potato crops, without counting other types of crops that vary depending on the area and ranging from smallholdings to industrialized crops. These agricultural and livestock farms have led to significant transformation and also caused serious changes in the composition, structure, and dynamics of these ecosystems, given by the destruction of native vegetation to give space to grazing areas for livestock farming and potato crops, as well as to the massive application of pesticides and fertilizers, which has generated losses of organic matter, alteration of biogeochemical cycles, and water retention (Rojas et al., 2012).

Although these studies have been developed in different contexts of agricultural cropping and in the evaluation of the changes that have taken place due to potato cropping and livestock farming, the necessity for more specific research in soils of the Páramo ecosystem becomes evident, as it is important to follow up the behaviour of the Neotropical ecosystems in the face of agricultural activities. Moreover, from this approach, recommendations for both the Páramos and similar ecosystems could be suggested.

The purpose of this research was to evaluate and analyze the impact of potato crops and livestock farming on the indicators of soil quality in the Northern Andean Páramo soils of the

neotropics, as in the case of Colombia, through the following objectives: (1) to evaluate the physical-chemical properties of the soils that are exposed to potato crops and livestock farming; (2) to evaluate the abundance of functional groups of microorganisms in the soils that are exposed; and (3) to analyze the impact of potato crops and livestock farming on the enzymatic activities of the soils that are exposed.

This research hypothesized that the physicochemical properties, the abundance of functional groups of microorganisms, and the enzymatic activities of the soil in the Páramo ecosystems could be modified significantly by the activities of livestock farming and potato cropping.

Materials and methods

Description of the site of study

The study was conducted in the municipality of Choachí, Cundinamarca (Colombia) located at the coordinates 04° 35'39" N, 73° 60' 08" W, 36.8 km in Bogotá (Figure 1).

Most of these soils are influenced by volcanic ash, and the parental material consists of shales, shales calcareous, sandstone, and volcanic ash, which are generally black due to the interaction between the allophane and the organic matter, and tend to be acidic, with a diversity of shrub species, which have high moisture retention (Ramirez, 2012). The predominant climate is cold with a temperature between 2 °C and 10 °C: there is significant rainfall throughout the year in the municipality of Choachí. Even the driest month still reports a lot of rain; the average rainfall is 1128 mm per year. The total population is 10,729 inhabitants divided into rural (7114 inhabitants) and urban (3615 inhabitants). A large part of its economy is based on the cultivation of potatoes and onions, and on livestock farming; also, Páramos are considered the main ecosystem in the area, because they possess endemic fauna and flora, in addition to providing different environmental services to the inhabitants of the municipality.

The potato (*Solanum tuberosum*) varieties cropped are *Parda Pastusa* and *R12* (Avellaneda-Torres, 2014). During harvest, the crop uses pesticides (carbofuran), insecticides (thiamethoxam or lambda cyhalothrin), herbicides (paraquat dichloride or fluzafop-p-butyl), and fungicides (chlorothalonil) (Díaz-Granados et al., 2017).

The *Norman* cow breed cattle is usually raised for the purpose of meat consumption requirements such as the production of milk, cheese, and meat,

Sampling location Evaluation of impacts of potato crops and livestock farming in Neotropical high Andean Páramo soils, Colombia

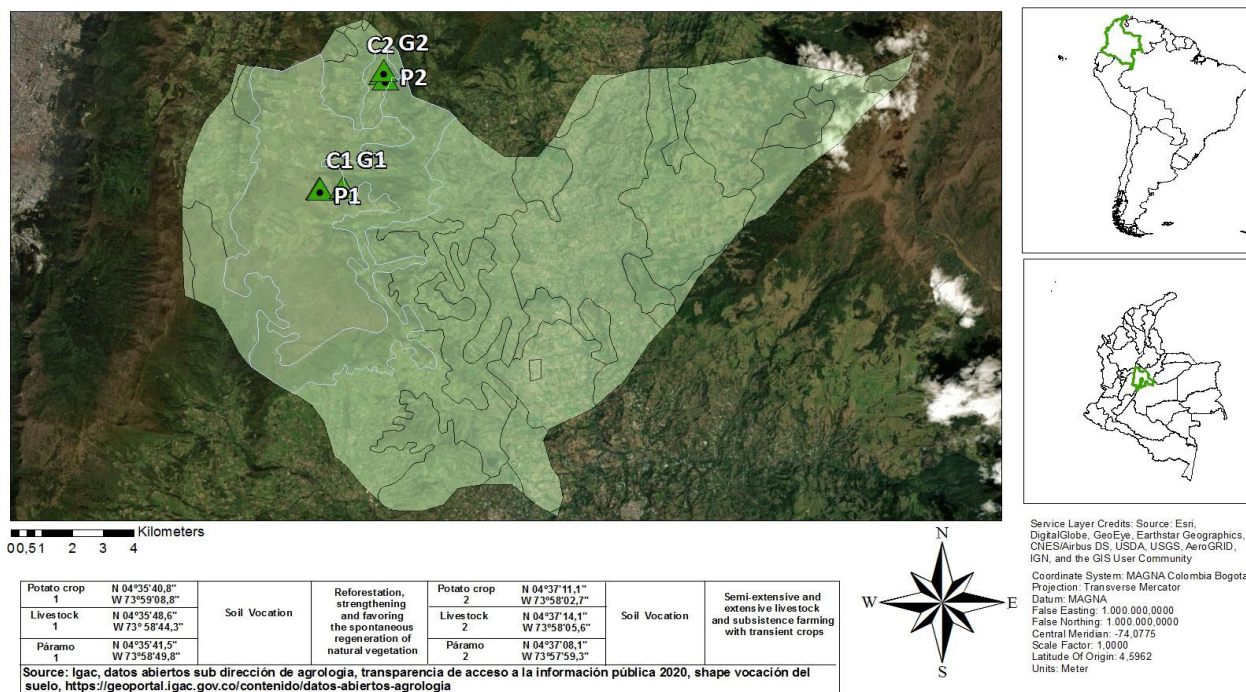


Figure 1. Geographic location of the study sites. P1: Páramo 1, P2: Páramo 2, L1: Livestock 1, L2: Livestock 2, C1: Potato Crop 1, C2: Potato Crop 2.

besides breeding, reproduction, and sale. This type of livestock is called extensive since there are large tracts of land with few animals that feed directly from what the land produces.

It is relevant to make clear that in this area, there is a combination of the traditional knowledge of peasants: resting periods in the cultivated soils should be allowed, cultivation time should be maximum two years in rotation with livestock farming, and as specified above, the proportion of the number of head of livestock on land extension should be small; with practices inherited from the Green Revolution, such as the application of the aforementioned agrochemicals.

Experimental design and soil sampling

In order to evaluate the hypothesis about the fact that the activities of potato cropping and livestock farming modify the properties of Páramo soils, soil sampling was carried out in July 2018, a month with the highest rainfall record. The gathered samples were named according to the use of the soil where they were collected, as follows:

1. Potato cropping soils. These crops showed rotation of place and had just been harvested at the time of the sample.

2. Livestock farming soils, modified by livestock farming, which were part of the potato-pasture rotation system.

3. Páramo soils that have not been intervened and maintain native vegetation such as frailejones (*Espeletia* sp.) and some shrubs like *Ageratina* sp and *Baccharis* sp.

Three samples were collected in every area with different soil use (potato cropping, livestock farming, Páramo), consisting of 10 subsamples; each sample was taken at two different heights: 3100 m.a.s.l. and 2970 m.a.s.l.. Samples were named and georeferenced (Table 1).

Sampling area was delimited for the sample collection, and observation of biotic conditions were recorded. The course was traced in zigzag for the collection of three samples, composed of 10 subsamples of the first 30 cm of soil for each soil use and altitude. Collected samples were deposited in plastic bags properly labelled and stored at -4 °C for microbiological analysis, -20 °C for enzymatic analysis, and room temperature for physicochemical analysis; all analyses were performed by triplicate in the laboratory.

Physicochemical analysis

Gravimetric humidity was determined by the gravimetric method; bulk density according to the cylinder method; pH in water according to the potentiometric method with soil: water (w/v) ratio of 1:1; organic carbon by the Walkley and Black method; exchangeable acidity by extraction with 1M potassium chloride (KCl); cation

Table 1. Coordinates and conventions of each land use: potato crops, livestock, and Páramo according to height in meters above sea level.

	Potato crop		Livestock		Páramo	Altitude (m.a.s.l.)
1	N 04°35'40,8" W 73°59'08,8"	1	N 04°35'48,6" W 73° 58'44,3"	1	N 04°35'41,5" W 73°58'49,8"	3100 (1)
2	N 04°37'11,1" W 73°58'02,7"	2	N 04°37'14,1" W 73°58'05,6"	2	N 04°37'08,1" W 73°57'59,3"	2970 (2)

Potato crop-1: Potato crop altitude1. Livestock 1: Livestock altitude1. Páramo 1: Páramo altitude1. Potato crop-2: Potato crop altitude2. Livestock 2: Livestock altitude2. Páramo 2: Páramo altitude2.

exchange capacity by means of extraction with 1N ammonium (NH₄) acetate; available phosphorus by the Bray III method; Bouyoucos soil texture; calcium, magnesium, potassium and sodium bases by extraction with 1N ammonium (NH₄) acetate (IGAC, 2006; Avellaneda et al., 2018).

Microbiological analysis

10g soil samples were suspended in 90 ml of 0.85% saline solution and vortexed for 10 minutes. Subsequently, 100µl of this suspension was used to make serial dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁹. Microorganisms abundance was assessed by isolations and counts made according to the plate counting method. Nitrogen-fixing bacteria counts and isolation was performed according to Rennie (1986) and modified by Avellaneda et al. (2014), consisting of a selective medium lacking nitrogen. Cellulolytic microorganisms were assessed according to Hendricks et al. (1995) and modified by Avellaneda et al. (2014). In this, colony forming unit are counted in medium with carboxymethylcellulose (CMC) at 1%. Phosphate solubilizer bacteria were assessed according to Pramer and Schmidt (1964); Sundara Rao and Sinha (SRS), and modified by Avellaneda et al. (2014). Bacteria culture was incubated at 25 °C for 48 hours., Fungi was incubated at room temperature for a period of five to seven days. Finally, viable cells were counted in the plates containing between 30 and 300 CFU.

Enzymatic analysis

Aiming to determine the enzymatic activity, 0.1 g of soil was collected; acid phosphatase, alkaline phosphatase, and β-glucosidase activities were assessed using 0.2 g soil samples. Enzymatic activity was determined by colorimetric methods according to Avellaneda et al. (2018). Urease method described by Alef and Nannipieri (1995) was used to determine the ammonium released from soil incubated samples with urea solution for 2 hours at 37 °C; ammonia is extracted with a Potassium Chloride solution and determined by a modified Berthelot reaction (Sodium Salicylate with Ammonia in the presence of Sodium Dichloroisocyanide). The protease

method described by Ladd and Butler (1972) used to determine the resulting amino acids after soil incubation in sodium caseinate for 2 hours at 50 °C using the Ciocalteu reagent. The β-Glucosidase method described by Eivazi and Tabatabai (1988) was also used for the colorimetric determination of the p-nitro phenol obtained by the action of the β-Glucosidase after soil incubation with the β-D-glucopyranoside substrate in a buffered medium at pH 6.0. The acid and alkaline phosphatase-based method described by Alef and Nannipieri (1995) was used to determine the p-nitrophenol released after soil incubation with p-nitrophenyl phosphate solution for 1 hour at 37 °C. Released p-Nitrophenol is extracted and coloured with Sodium Hydroxide and photo-metrically determined.

Statistical analysis

The assumptions of independence, variance homogeneity and normality were assessed in order to determine the use of the parametric statistics; for the normality analysis the Shapiro-Wilk test was used, but because the data did not satisfy the assumption of normality, the Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Kolmogorov-Smirnov, and Tukey, nonparametric tests were applied with a significant level of P ≤ 0.05. All tests were performed with the free software R 2.10.0.

Multivariate analysis was carried out using the principal component analysis method (PCA), and the simple correspondence analysis (SCA) (soil use vs. physicochemical, microbiological, and enzymatic properties). This test was performed using the free software R 2.10.0 and the SPAD v.7 software.

Results

Physicochemical analysis

Soil water content in Páramo-1 and Páramo-2 was 79.6% and 89.7%, respectively, while potato cropping-1 (36.8%) and potato cropping-2 (33.4%) presented significantly lower humidity (Figure 2A). In this way, the trend regarding soil moisture at Páramo > Livestock > Potato crops was maintained.

The most intervened soils had high apparent density at both heights (Potato cropping-1: 0.027 g/cm³, and Potato cropping-2: 0.032 g/cm³) followed by Livestock farming-1: 0.016 g/cm³ and Livestock farming-2: 0.018 g/cm³, which were also high (Figure 2B). A significant trend related to apparent density was Potato cropping > Livestock farming > Páramo.

In less intervened soils, high content of organic carbon was found (Páramo-1: 18.6%, and Páramo-2: 22.7%). These results presented significant differences with respect to the results of livestock and potato crops (Figure 2C), showing significant trend for Páramo > Livestock farming > Potato cropping in terms of the organic carbon.

Cation exchange capacity for Páramo soil was significantly higher in Páramo-1: 66 cmol/kg and Páramo-2: 73.7 cmol/kg; while lower for Potato cropping-1: 29.4 cmol/kg, and Potato cropping-2: 40.2 cmol/kg soils (Figure 2D).

Results showed phosphorus availability with significant difference with higher levels in most intervened soils (Potato cropping-1: 125 mg/kg, and Potato cropping-2: 136 mg/kg), in relation to Livestock farming and Páramo (Figure 2-E). No statistically significant differences for pH, interchangeable acidity, exchangeable aluminium saturation and total bases were observed (Table 2).

Table 2. Physicochemical analysis results of Páramo soils, livestock and potato crop.

Soil uses	pH	I.A. (cmol/kg)	S.I.A (%)	Total bases (cmol/kg)
Potato crop 1	4.3a*	10.6a	92.7a	107.60a
Potato crop 2	4.5a	9.6a	77.0a	91.10a
Livestock 1	4.7a	7.0a	77.3a	89.00a
Livestock 2	5.1a	8.4a	20.1a	33.60a
Páramo-1	5.0a	2.1a	29.7a	36.80a
Páramo-2	4.2a	1.6a	92.7a	98.50a

Potato crop 1: altitude 3100 m.a.s.l.. Livestock 1: altitude 3100 m.a.s.l.. Páramo 1: altitude 3100 m.a.s.l.. Potato crop 2: altitude 2970 m.a.s.l.. Livestock 2: altitude 2970 m.a.s.l.. Páramo 2: altitude 2970 m.a.s.l.. I.A: Interchangeable Acidity. S.I.A: Saturation of Interchangeable Aluminium. Total Bases: Calcium, Magnesium, Potassium, and Sodium. Equal letters mean that there are no differences $p < 0.05$.

Microbiological analysis

Nitrogen-fixing bacteria values did not present a significant difference and ranged from 5.43E+07 CFU / g ss to 7.15E+06 CFU/g H.H (Figure 3A and 5). Phosphate-solubilizing bacteria (Figure 3B) and fungi (Figure 5), presented a similar trend between them in Páramo soils, with no significant difference. Values ranged from 4.37E + 04 CFU / g ss to 6.43E + 05 CFU / g ss for bacteria, and from 4.12E + 02 CFU / g ss to 2.01E + 04 CFU / g ss for fungi.

Figures 3D and 5 present the results for cellulolytic bacteria, and Figures 3E and 5 for fungi, which had no significant differences. Values ranged from 2.79E+ 02 CFU / g ss and 1.18E + 05 CFU / g ss for fungi, and 2.63E + 09 CFU / g ss and 9.74E + 10 CFU / g ss for bacteria; no significant differences were reported in terms of functional groups of microorganisms for altitude variation.

Analysis of enzymatic activities

Urease presented the highest enzymatic activity in soils (Páramo 1: 78.9 ug*N/g*dm*2h) (Figures 4A and 5), followed by livestock farming 1 soil (56.06 ug*N/g*dm*2h), and lowest potato cropping 1 soil (44.86 ug*N/g*dm*2h). This trend was only seen in height 1, where the uses of the soil presented significant differences; at height 2, there were no significant differences. Protease behaved opposite to urease, with the highest activity potato cropping 1 soil (1.35 ug*N/g*dm*2h), and Potato cropping 2 (1, 62 ug*N/g*dm*2h); and the lowest on Páramo-1 soil (0.58 ug*N/g*dm*2h), and Páramo-2 (0.76 ug*N/g*dm*2h) (Figures 4B and 5); however, these results did not show significant differences in terms of land use or height.

Acid phosphatase activity was similar to urease, with greater enzymatic activity Páramo 1 soil (6.07 ug*N/g*dm*2h) and lower on potato cropping 1 soil (15, 12 ug*N/g*dm*2h). This was only observed at height 1, while at height 2, there were no significant differences by land uses (Figures 4C and 5). The alkaline phosphatase activity (Fig. 4D, Fig. 5) did not present significant differences in terms of land uses, nor in terms of heights. β -Glucosidase activity was low in Páramo 1 soil (9.01 ug*N/g*dm*2h) and Páramo 2 (5.35 ug*N/g*dm*2h) showed lower enzymatic activity; and Potato cropping 1 soil (18.79 ug*N/g*dm*2h) and Potato cropping 2 soil (27.91 ug*N/g*dm*2h) higher activity of this enzyme. In this case, there were significant differences in terms of land use but not in terms of heights (Figures 4E and 5).

Discussion

Hypothesis of potato cropping and livestock farming that modify the physicochemical soil properties, abundance of functional groups of microorganisms, and the enzymatic activities in Páramo soils, which are important in a context of conservation of strategic ecosystems in the neotropics ecozone, was evaluated. According to the results, in terms of physicochemical properties, the gravimetric humidity reflected the advantages of Páramo soils that still retain their native vegetation, thus conserving humidity. In the case of livestock farming soils, less moisture was observed even with remnant vegetation cover;

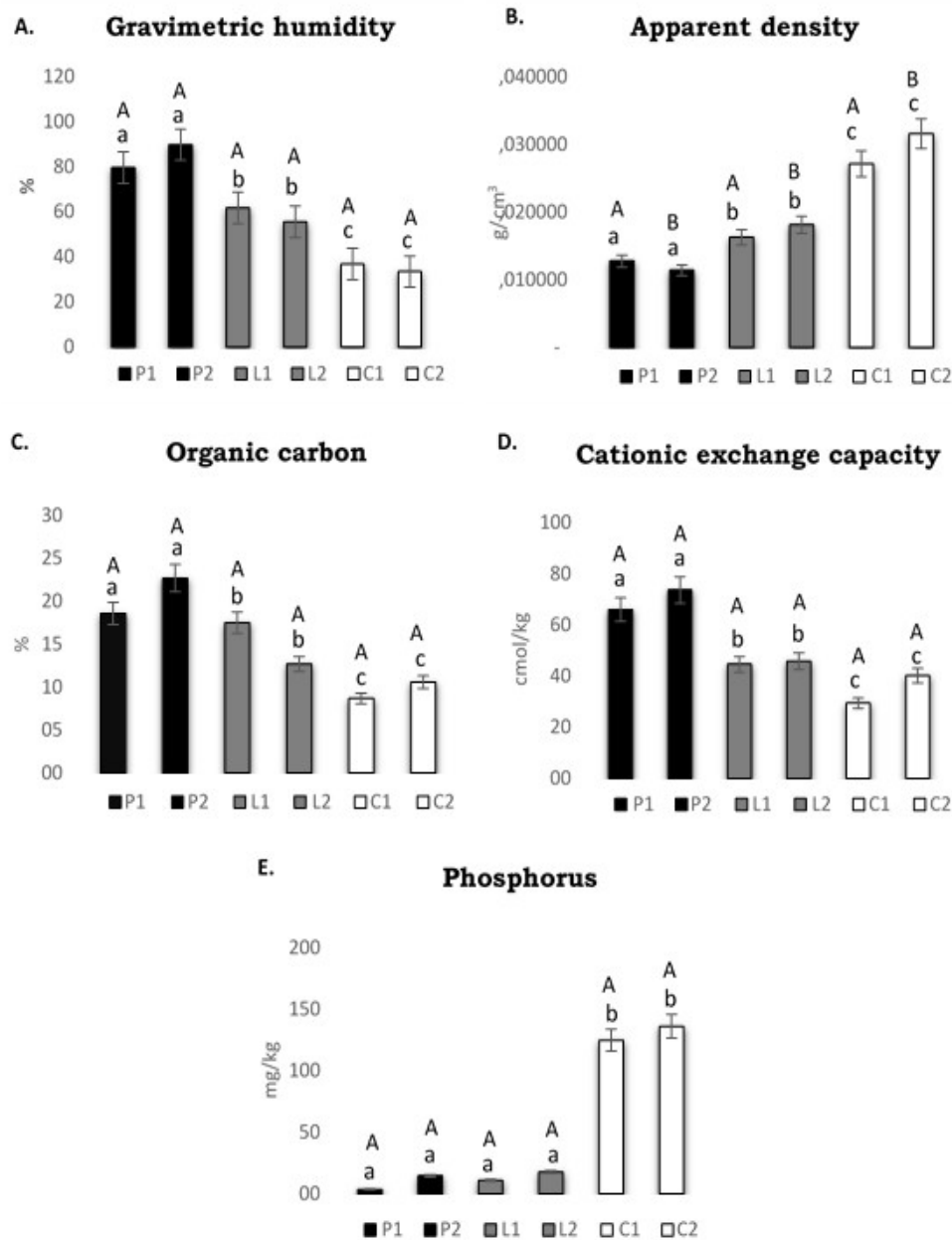


Figure 2. Physicochemical parameters in Páramo, livestock and potato crop soils. A. Gravimetric Humidity. B. Apparent Density. C. Organic Carbon. D. Cation Exchange Capacity. E. Phosphorus. P1: Páramo 1, P2: Páramo 2, L1: Livestock 1, L2: Livestock 2, C1: Potato Crop 1, C2: Potato Crop 2. Same lowercase letter does not have a significant statistical difference between uses. Same capital letter does not have a significant statistical difference between altitudes.

livestock farming soil was affected by permanent trampling affecting water retention and water soil content. Cropped soils showed lower humidity, due to the fact that they were more exposed to sun rays and air, increasing evaporation on their surface, and losing the ability to contain moisture (Daza et al, 2014). In terms of apparent density, Páramo soils showed low density, mainly due to high carbon content (Daza et al., 2014); livestock farming soils were already beginning to be compacted, which is associated with the permanent trampling of cattle, while cropped soils exhibited higher apparent density, which was associated with tillage.

Páramo soils revealed significantly higher content of organic carbon with a high correlation with the content of humidity. Livestock farming soils presented less content of organic matter, as they were affected by the trampling actions of the livestock; and potato crops soil showed a very low level of organic carbon due to change of vegetation cover (Martínez, 2008). Organic matter was related to the cation exchange capacity, since it determined the retention and accessibility of nutrients to plants, and it was a way to confirm that given uses to soil affected its quality.

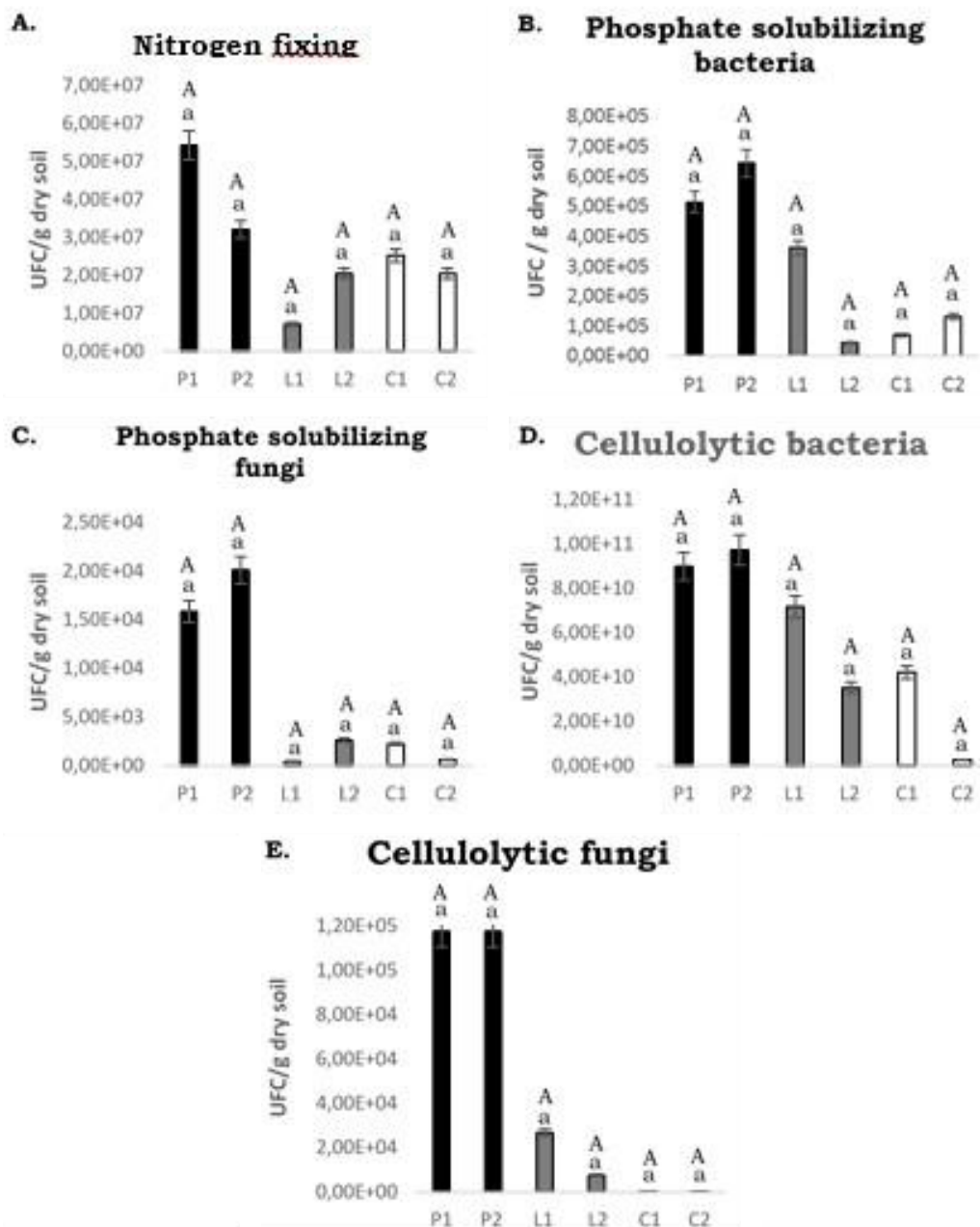


Figure 3. Abundance of functional groups of microorganisms in Páramo, livestock and potato cultivation soils. A. Nitrogen-fixing. B. Phosphate Solubilizing Bacteria. C. Phosphate Solubilizing Fungi. D. Cellulolytic Bacteria. E. Cellulolytic Fungi. P1: Páramo 1, P2: Páramo 2, L1: Livestock 1, L2: Livestock 2, C1: Potato Crop 1, C2: Potato Crop 2. Same lowercase letter does not have a significant statistical difference between uses. Same capital letter does not have a significant statistical difference between altitudes

Phosphorus content presented low levels in Páramo soil due to the retention processes of the ecosystem, according to Casasbuena et al. (2006). Iron and aluminium compounds as well as soil fauna, favour the humification processes; in contrast, there were high levels of phosphorus in crops, possibly caused by the use of phosphate fertilizers.

Due to low temperatures, high relative humidity and precipitation, the decomposition of soil organic matter was carried out at very low

rates, exhibiting high content of organic matter, high porosity, and good hydraulic conductivity (Díaz-Granados et al., 2005), hence in these soils without intervention, the tendency in terms of humidity and high organic carbon content, with respect to soils with potato crop and livestock farming intervention, will still be preserved.

Microorganisms abundance had significant differences among soil uses or altitude. Fungi and phosphate-solubilizing bacteria presented greater abundance in Páramo soils compared

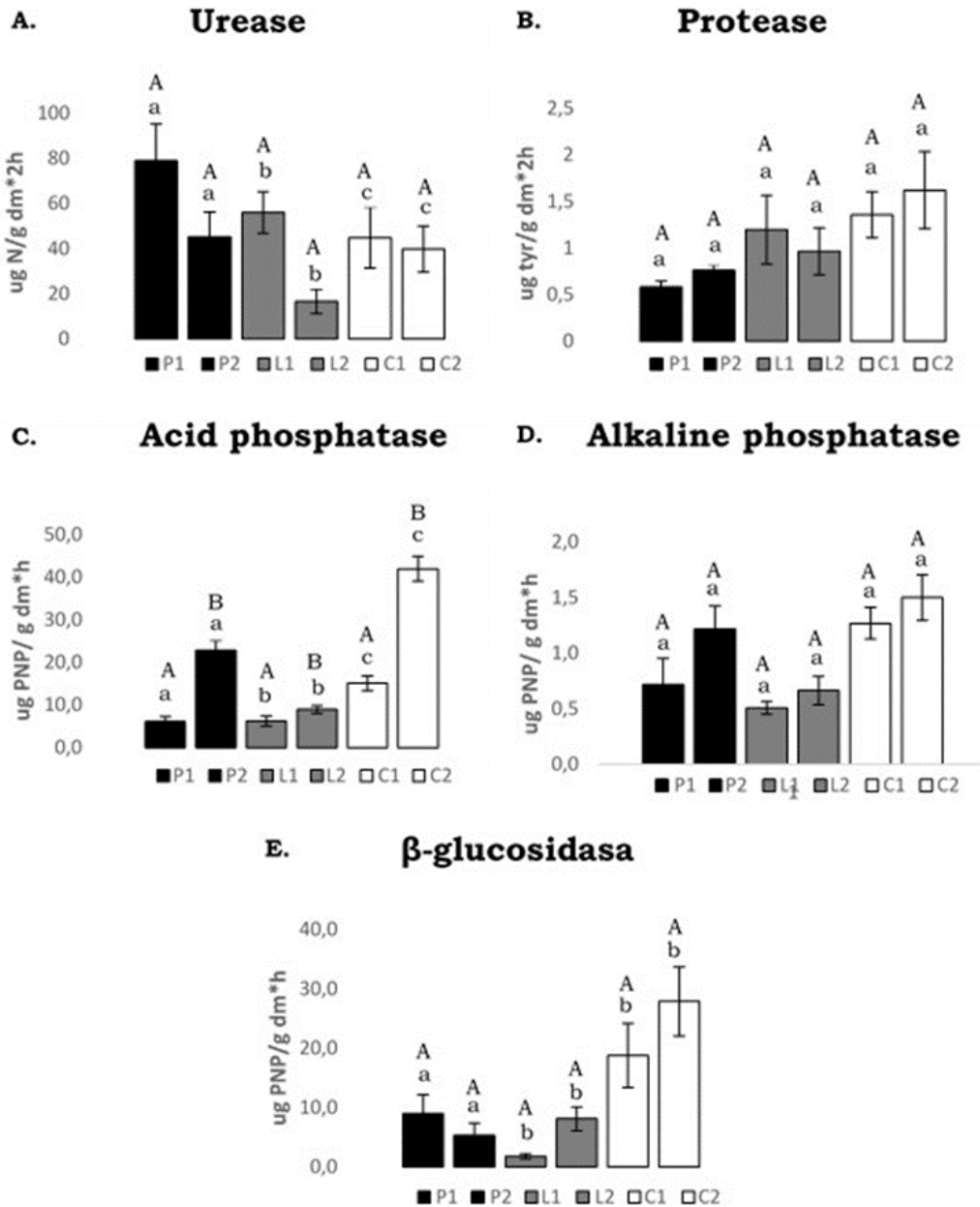


Figure 4. Enzymatic activities in Páramo, livestock and potato cultivation soils. A. Urease. B. Protease. C. Acid Phosphatase. D. Alkaline Phosphatase. E. β -Glucosidase. P1: Páramo 1, P2: Páramo 2, L1: Livestock 1, L2: Livestock 2, C1: Potato Crop 1, C2: Potato Crop 2. Same lowercase letter does not have a significant statistical difference between uses. Same capital letter does not have a significant statistical difference between altitudes.

to potato crop and livestock farming due to the natural processes of phosphate solubilization present that can be inhibited by using fertilizers in potato crops (Moratto et al, 2005). Statistically, there were no significant differences among soil use; following these practices should be taken as an early warning.

Cellulolytic fungi and bacteria were more abundant in Páramo soil compared to other soil uses; a lower abundance in cropped soils was probably due to the application of agricultural

inputs, which caused the biological component of the soil to be diminished (Fan et al., 2012), and the loss of organic matter caused by the mechanical removal and turning of soil. However, there were no significant differences for soil use, which is a warning sign for the future if these practices continue.

Urease activity was greater in Páramo soils, and fewer activity was found in livestock farming and in potato cropped soil. This decrease was related to the loss of vegetation cover; so, there

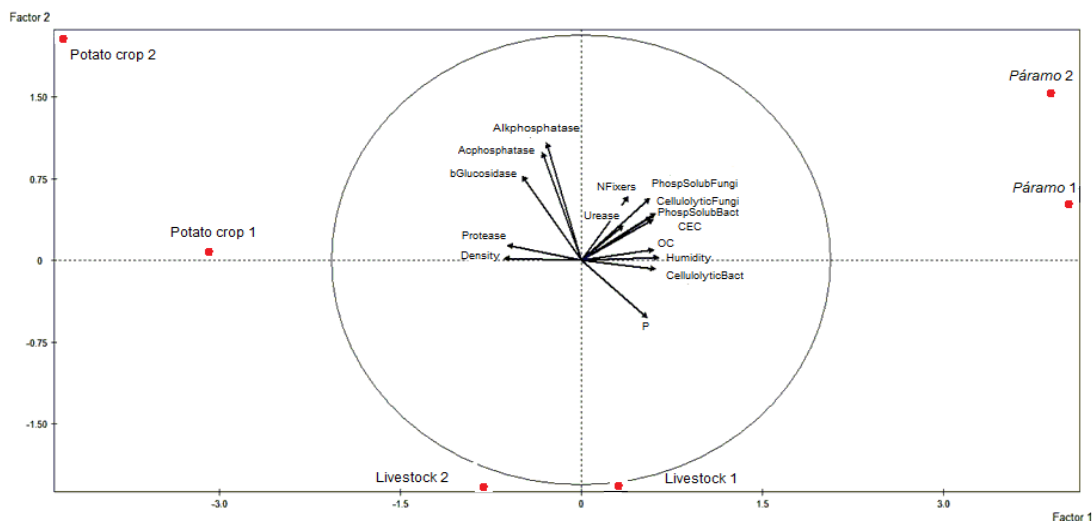


Figure 5. Principal Components Analysis (PCA) of physicochemical parameters, abundance of functional groups of microorganisms and enzymatic activities.

was more activity in Páramo due to a greater vegetation cover that protects the microorganisms and the enzymatic activities; while in Potato crop-1, the urease activity was affected by the pesticides that could inhibit the microorganisms that this enzymatic activity produced (Das and Varma, 2011)

Protease activity had no significant differences for different soil uses. These results are consistent with the reported by Avellaneda et al. (2012), who stated that this may be due to the fact that during the growth stationary phase of the bacterial consortiums and a specific morphotype is responsible for one or the other activity (García et al., 2000). Urease and protease activity can be determined during the growth phase, where microorganisms associated with enzyme activity are found, therefore, during the stationary phase, the priority was given to protease or urease activity (Avellaneda et al., 2012).

Acid phosphatase activity presented the highest activity at height 1 and cropped soils, where the use of agrochemicals can modify the soil pH and favour the activity of this enzyme, as indicated by Dick and Tabatabai (1984); Páramo soil presented the lowest activity, even though it is favoured by the available soil nutrient content. At height 2 there was no clear trend showing changes related to potato cropping and livestock farming activities. Alkaline phosphatase activity did not present a significant impact on potato cropping and livestock farming in the soils under study.

β -Glucosidase showed more activity in cropped and livestock farming soil, this would mean that humic substances were degraded by potato cropping and livestock farming, and improve the accessibility for enzymatic activities. Since humic substances are complex and difficult to modify biochemically

(Avellaneda-Torres et al., 2013), there was less activity in Páramo soils. In this case, the initial hypothesis of the investigation is partially confirmed according to the changes presented in enzymatic activities of nitrogen (protease), phosphorus (acid phosphatase), and carbon (β -Glucosidase). The previous results are corroborated by principal component analysis (Figure 5)

Conclusion

Nine physicochemical parameters were analysed; gravimetric humidity, bulk density, organic carbon, capacity of cation exchange, and phosphorus presented significant differences and confirmed the initial hypothesis. From the five enzymatic activities evaluated, three of them (urease, acid phosphatase, and β -Glucosidase) showed significant differences and confirmed the changes produced by the activities of potato cropping and livestock farming. The abundance of microorganisms did not present significant differences related to the agricultural activities; however, the suggestion is to assume them as an early warning of more pronounced damages in the case of continuing with same practices in Páramo soils.

References

- Alef, K.; Nannipieri, P. 1995. *Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms*. p 123-191. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. United States 608 p. <https://doi.org/10.1016/B978-012513840-6/50014-8>
- Alef, K.; Nannipieri, P. 1995. *Enzyme activities*. p 311-373. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. United States.

- 608p. <https://doi.org/10.1016/B978-012513840-6/50014-8>
- Avellaneda, L. M.; Melgarejo, L. M.; Narváez, C. E.; Sánchez, J. 2012. Actividades enzimáticas en consorcios bacterianos de suelos bajo cultivo de papa con manejo convencional y bajo pastizal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6349-6360. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/30761>.
- Avellaneda-Torres, L. M.; Melgarejo, L. M.; Narváez-Cuenca, C. E.; Sánchez, J. 2013. Enzymatic activities of potato crop soils subjected to conventional management and grassland soils. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(2), 301-312. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000025>
- Avellaneda, L. M.; Guevara, C. P.; Torres, E. 2014. Assessment of cellulolytic microorganism in soils of Nevados Park, Colombia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1211-1220. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822014000400011>
- Avellaneda, L. M.; Leon, T. E.; Torres, E. 2018. Impact of potato cultivation and cattle farming on physicochemical parameters and enzymatic activities of Neotropical high Andean Páramo ecosystem soils. *Science of the Total Environment*, 631-632, 1600-1610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.137>
- Carrillo-Rojas, G.; Silva, B.; Rollenbeck, R.; Celleri, R.; Bendix, J. 2019. The breathing of the Andean highlands: Net ecosystem Exchange and evapotranspiration over the Páramo of southern Ecuador. *Agricultural and Forest Meteorology*, 265, 30-47. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.11.006>
- Casasbuenas, L.; Prieto, J.; Estupiñan, L.H. 2006. Efecto de la quema sobre algunas propiedades físico-químicas del suelo en el Páramo Rabanal, Samacá-Boyacá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 9(1), 97-106. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/2501>
- Das, S. and Varma, A. 2011. Role of enzymes in maintaining soil health. P 25-42. In: *Soil enzymology*. Springer Nature Switzerland. 384 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3>
- Daza, M.; Hernández, F.; Triana, F. 2014. Efecto del uso del suelo en la capacidad de almacenamiento hídrico en el Páramo de Sumpaz-Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 67(1), 7189-7200. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/42642>
- Díaz-Granados, M. A.; Navarrete J. D.; Suarez, T. 2005. Páramos: Hidrosistemas Sensibles. *Revista de Ingeniería*, 22, 64-75. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932005000200008&lng=en&tlng=es
- Dick, W.A.; Tabatabai, M.A. 1984. Kinetic-parameters of phosphatases in soils and organic waste materials. *Soil Science*, 137, 7-15. <http://10.1097/00010694-198401000-00002>
- Eivazi, F.; M.A. Tabatabai. 1988. Glucosidasas and galactosidasas in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5): 601-606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Fan, F.; Li, Z.; Wakelin, S. A.; Yu, W.; Liang, Y. 2012. Mineral fertilizer alters cellulolytic community structure and suppresses soil cellobiohydrolase activity in a long-term fertilization experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 55, 70-77. <http://10.1016/j.soilbio.2012.06.008>
- García, C.; Hernández, T.; Pascual, J.; Moreno, M.R.; Ros, M. 2000. *Actividad microbiana de suelos del sureste español sometidos a procesos de degradación y desertificación. Estrategias para su rehabilitación*. p. 43-92 En: García, C.; Hernández, T. eds. *Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España*. Murcia: Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. 352 p.
- Hendricks, C.; Doyle, J.; Hugley, B. 1995. A new solid medium for enumerating cellulose – utilizing bacteria in soil. *Applied and environmental microbiology*, 61(5), 2016-2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388450/pdf/hw2016.pdf>
- Hofstede, R. 2001. *El impacto de las actividades humanas sobre el Páramo*. En: *Los Páramos Ecuatorianos particularidades, problemas y perspectivas*. Editorial Abya-Yala. Proyecto Páramo. Quito, Ecuador. 310 p.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 2006. *Métodos analíticos del laboratorio de suelos*. Sexta Edición. Bogotá, Colombia. 684 p.
- Ladd, J.; Butler, J. 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*. 4(1), 19-30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
- Llambí, L.; Soto, A.; Celleri, R.; de Bièvre, B.; Ochoa, B.; Borja, P. 2012. *Ecología, Hidrología y suelos de Páramos*. Proyecto Páramo Andino. Editorial Condesan. Quito, Ecuador. 283 p.
- Martínez, E.; Fuentes, J.; Acevedo, E. 2008. Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*. 8(1), 68 – 96. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006>
- Moratto, C.; Martínez L. J.; Valencia, H.; Sánchez, J. 2005. The effect of land use on phosphate solubilising fungi and diazotrophic bacteria on the bleak uplands of Páramo Guerrero, Cundinamarca department. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 299-309. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652005000200015&lng=en&tlng=es
- Myers, N.; Mittermeier, R.; Mittermeier, C.; da Fonseca, G.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Pramer, D.; Schmidt, E. 1964. *Experimental soil microbiology*. Burgess Publishing Company. Minnesota. USA. p.211.
- Ramírez, C. R.; Duarte, C. H.; Galeano J. O. 2012. Estudio de suelos y su relación con las plantas en el páramo el Verjón ubicado en el municipio de Choachí Cundinamarca. *TECCIENCIA*, 6 (12), 56-72. <http://tecciencia.ecci.edu.co/index.php/TECCIENCIA/article/view/48/36>

Rennie, R.J. 1986. Advantages and disadvantages of nitrogen-15 isotope dilution to quantify dinitrogen fixation in field-grown legumes. A critique. P 43-58. In *Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification*, Volume 18. *Soil Science Society of America*. 115p. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.2136/sssaspecpub18>

Rojas, C.; Camacho-Rojas, A.; Bustamante-Zamudio, C. 2012. *Evaluación ambiental estratégica del sector agropecuario altillanura y alta montaña cundiboyacense*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Bogotá, Colombia. 35 p. <http://hdl.handle.net/20.500.11761/31296>

Vargas-Ríos, O.; Díaz-Triana, J. E.; Reyes-Bejarano, S. P.; Gómez-Ruiz, P. A. 2012. Guías técnicas para la restauración ecológica de ecosistemas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Bogotá, Colombia. 136 p. https://www.minambiente.gov.co/images/boques/BiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/plan_nacional_restauracion/Anexo_8_Guias_Tecnicas_Restauracion_Ecologica_2.pdf

Metabolismo de *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* como mecanismo de resistencia a imazapyr y imazapic

Echinochloa crusgalli var. *Mitis* metabolism as resistance mechanism to imazapyr and imazapic

Joice Fernanda Lübke Bonow ¹, André Andres ², Fabiane Pinto Lamego ³

¹ Universidade Federal de Pelotas. Rio Grande do Sul, Brasil. ✉ joicef.agronomia@gmail.com

² Embrapa, Pelotas. Rio Grande do Sul, Brasil. ✉ andre.andres@embrapa.br

³ Embrapa, Pelotas. Rio Grande do Sul, Brasil. ✉ fabiane.lamego@embrapa.br

Rec.: 25-07-2019 Acep.: 17-02-2020

Abstract

Selection pressure caused by continuous use of imazapyr and imazapic herbicides in rice fields without crop rotation, has selected for resistant biotypes of *Echinochloa crusgalli* var. *mitis*. To know the mechanism of resistance involved becomes important in order to define effective management strategies. Therefore, the objective of this work was to verify if enhanced metabolism of herbicide is responsible for imazapyr and imazapic resistance in *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* biotypes from Rio Grande (ECH38 resistant and ECH44 susceptible), Pelotas (ECH1 resistant and ECH14 susceptible) and Arroio Grande (ECH27 resistant) in the state of Rio Grande do Sul. For this purpose, forty-nine biotypes were collected from the southern region of the state in areas with barnyard grass control difficulties with ALS inhibitor herbicides. The treatments of study consisted of application of malathion (1000 g a.i. ha⁻¹) and piperonyl butoxide (525 g a.i. ha⁻¹), inhibitors of the cytochrome P450 mono-oxygenase enzymes and after 60 minutes, preceding herbicide application (73.5 + 24.5 g a.e. ha⁻¹). Visual control evaluations were taken at 14 and 28 days after treatments (DAT) and shoot dry mass (SDM) determination at 28 DAT. The results indicate that the application of inhibitors does not alter the control response of the ECH38, but shows a significant increase in phytotoxicity in 28 DAT, with values of 78% for the ECH1. The use of Malathion associated with the herbicide provided a reduction in the SDM of 1.34 g.plant⁻¹ in relation to the isolated application of herbicide and for piperonyl butoxide (PBO) of 1.28 g.plant⁻¹ for the resistant biotype from Pelotas. For ECH27, the SDM reduction was lower than the values of 0.87 g.plant⁻¹ for Malathion and 1.04 g.plant⁻¹ for PBO. The resistance mechanism to imazapyr + imazapic herbicide in Pelotas and Arroio Grande biotypes is related to increased metabolism of the herbicide, and it cannot be stated that this mechanism is involved in the resistance of the ECH38 biotype.

Keywords: Enzyme inhibitors; Herbicides; Herbicide selectivity; Plant metabolism; Weed control.

Resumen

La presión de selección causada por el uso continuo de herbicidas imazapyr e imazapic en campos de arroz sin rotación de cultivos, ha seleccionado biotipos resistentes de *Echinochloa crusgalli* var. *mitis*. Conocer el mecanismo de resistencia involucrado se vuelve importante para definir estrategias de manejo efectivas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue verificar si el metabolismo mejorado del herbicida es responsable de la resistencia a imazapyr e imazapic en *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* de Rio Grande (resistente a ECH38 y susceptible a ECH44), Pelotas (resistente a ECH1 y susceptible a ECH14) y Arroio Grande (resistente a ECH27) en el estado de Rio Grande do Sul. Para ello, se recolectaron cuarenta y nueve biotipos de la región sur del estado en áreas con dificultades de control de pastos de corral con herbicidas inhibidores de ALS. Los tratamientos de estudio consistieron en la aplicación de malatión (1000 g ia ha⁻¹) y butóxido de piperonilo (525 g ia ha⁻¹), inhibidores de las enzimas monooxigenasa del citocromo P450 y a los 60 minutos, previa aplicación del herbicida (73,5 + 24,5 g ae ha⁻¹). Se realizaron evaluaciones de control visual a los 14 y 28 días después de los tratamientos (DAT) y determinación de la materia seca de la planta (SDM) a los 28 DAT. Los resultados indican que la aplicación de inhibidores no altera la respuesta de control de la ECH38, pero muestra un aumento significativo de fitotoxicidad en 28 DAT, con valores de 78% para la ECH1. El uso de Malatión asociado al herbicida proporcionó una reducción en el SDM de 1.34 g. planta⁻¹ en relación a la aplicación aislada de herbicida y para el butóxido de piperonilo (PBO) de 1,28 g.planta⁻¹ para el biotipo resistente de Pelotas. Para ECH27, la reducción del SDM fue inferior a los valores de 0,87 g. planta⁻¹ para Malatión y 1,04 g.planta⁻¹ para PBO. El mecanismo de resistencia al herbicida imazapyr + imazapic en los biotipos Pelotas y Arroio Grande está relacionado con un aumento del metabolismo del herbicida, y no se puede afirmar que este mecanismo esté involucrado en la resistencia del biotipo ECH38.

Palabras clave: Control de malezas; Herbicidas; Inhibidores enzimáticos; Metabolismo; Selectividad herbicida.

Introduction

Echinochloa crusgalli L. var. *mitis* (barnyard grass) is one of the main weeds occurring in rice fields, distributed worldwide. Barnyard grass presents serious problems of herbicides resistance in several places in the world like Asia and the United States (Zhang et al., 2017). The continuous use of herbicides with the same mechanism of action, associated to the absence of crop rotation and high populations of barnyard grass, has allowed the evolution of resistance of this weed to several products. In some cases, multiple resistance has been characterized (Molin et al., 2016). Propagation of resistant biotypes can be accelerated by pollen-mediated gene flow, transferring resistance alleles to previously sensitive populations (Yu et al., 2010).

In irrigated rice crops in southern Brazil, imazapyr and imazapic are widely used as herbicides and the lack of herbicide rotation in treated areas has favoured the selection of resistant barnyard grass, which was confirmed in a previous study with *E. crusgalli* var. *mitis* biotypes from Pelotas, Rio Grande and Arroio Grande in Rio Grande do Sul state, Brazil (Bonow et al., 2018).

Resistant weeds can survive herbicide application via a variety of mechanisms, divided into two categories: target-site resistance (TSR) and non-target-site resistance (NTSR) (Délye et al., 2013). TSR mechanisms include increased expression of the target protein resulting from regulatory mutations causing target protein overproduction that compensates for the herbicide inhibitory action, and/or structural changes to the herbicide binding site that modify the structure and electrochemical properties of the target protein. NTSR mechanisms include the reduction in herbicide penetration due to alterations in cuticle properties and plant growth characteristics; sequestration and altered translocation of the herbicide away from the target protein; enhanced degradation (metabolism) of the herbicide and enhanced neutralization of cytotoxic molecules generated by herbicide action (Délye et al., 2013).

Weed biotypes with resistance to ALS inhibitors have mainly alterations in the herbicide target enzyme resulting from mutations in the corresponding gene or, more rarely, increased herbicide metabolism in the plant (Yu and Powles., 2014). Nowadays, with advances in the NTSR resistance studies, it is believed that some resistant species may in addition to TSR, have metabolism as a mechanism causing resistance (Délye et al., 2013). Given the complexity with polygenic inheritance, studies involving NTSR are still in progress.

The resistance of weeds caused by metabolization is an important mechanism, since it allows a plant to become resistant to herbicides of different mechanisms of action and even to products never used before to control the species in an area (Powles and Yu, 2010). It occurs from increased rates of metabolic detoxification of the herbicide. This 'protection' is performed by certain enzymes and other plant defense proteins, mainly of cytoplasmic location, with a wide range of specificity (Hatzios and Penner, 1982).

Herbicide metabolism in plants occurs in three phases, the first being the detoxification performed by enzymes called cytochrome P450 monooxygenases (cyt-P450), which alter the structure of the herbicides by reduction, hydrolysis, hydroxylation or dealkylation of the molecule; this makes the herbicide molecule more reactive (Powles and Yu, 2010). In the second phase of metabolization, the conjugation of the altered molecules with glucose, glutathione, amino acids, proteins or other organic compounds, through enzymes such as glycosyltransferases and glutathione S-transferases (GSTs), form stable, polar (S- glutathione) and less toxic compounds (Yuan et al., 2007; Ogliari et al., 2009). In the third and last stage, transport of these conjugated molecules to the extracellular space or the vacuole can involve ABC transporters (Yuan et al., 2007).

Inhibition of enzymes that act on the cyt-P450 complex by the application of malathion and amitrole insecticides has served as an indirect way of investigating whether metabolism of the herbicide is involved as a mechanism of resistance. The inhibitor 1-aminobenzotriazole (ABT) confers metabolic resistance of *Bromus tectorum* to chlortoluron herbicide via cyt-P450 (Gorinova et al., 2014). *Echinochloa phyllopogon* biotypes were also identified with metabolic resistance to penoxsulam after previous application of malathion (Yasuor et al., 2009).

The hypothesis of this research is that barnyard grass biotypes resistant to the herbicide mixture of imazapyr and imazapic by enhanced metabolism. Knowledge of a mechanism of low-level resistance in barnyard grass to this herbicide mixture is necessary, in order to establish management strategies in irrigated rice crops.

The objective of this study was to verify if such mechanism is involved in the resistance of *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* biotypes to ALS inhibitor herbicides.

Material and methods

A study was conducted by duplicate in a greenhouse belonging to Embrapa Clima Temperado, at the Terras Baixas experimental station, Capão do Leão-RS (31°80'S e 52°40'W,

13 m.a.s.n.l) during the period from December 2014 to March 2015. The experimental was completely randomized design (CRD), with four replications. The climate of the region, according to the climatic classification of Wilhelm Köppen (1930) is Cfa (C: hot mesothermal climate, with average cold months between 3 and 18 °C; f: average monthly rainfall of not less than 60 mm - always humid; and a: temperature of the hottest month above 22 °C), with average temperature of 26 °C during the conduction of the experiment.

Seeds of *E. crusgalli* var. *mitis* biotypes were collected from plants in rice fields in southern Brazil and then cleaned, dried (13% humidity) and stored at room temperature until the test was initiated. Seeds were sown in trays and transplanted to plastics pots, with a volumetric capacity of 0.5 l. Plants with 3 to 4 expanded leaves were sprayed with imazapyr + imazapic (73.5 + 24.5 g a.e. ha⁻¹; grams of acid equivalent per hectare), aiming to screen for herbicide resistance (Table 1) (Bonow et al., 2018). The plants that survived the applied dose were cultivated in plastic buckets for one generation in a greenhouse until the production and collection of seeds, avoiding outcrosses by isolating the plants in separate greenhouses. After harvesting the seeds, they were subjected to dormancy (Brasil, 2009).

In the same year, seeds harvested of each biotype were sowed in plastic trays and the seedlings transplanted to plastic containers of 0.7 L containing in soil classified as an Albaqualfs (Soil Survey Staff, 2014), or Planossolo Háplico Eutrófico Distrófico (Santos et al., 2013). Experimental units were composed of one plant per pot. Soil pH in water was 5.0; cation exchange

capacity, CEC_{pH7} = 7.1 cmol_c dm⁻³; organic matter = 1,8%; clay = 14%; texture = 4 (Santos et al., 2013); Ca = 4.1 cmol_c dm⁻³; Mg = 1.1 cmol_c dm⁻³; Al = 1.6 cmol_c dm⁻³; P = 6.5 mg dm⁻³ and K = 0.15 cmol_c dm⁻³. Fertility was corrected according to recommendations for irrigated rice (Sosbai, 2018). The resistance factor (RF) of the biotypes was determined in a parallel experiment in the 28 days after treatment (DAT) (Bonow et al., 2018), where the dose causing 50% of plant mortality of the resistant biotype (C50) was divided by the dose that causes 50% of mortality to susceptible plants. However, it was not possible to determine RF for ECH38, as it did not reach such control level. The RF was 15.2 or 10.2 for ECH1 and 27.9 or 18.6 for ECH27, in division with the susceptible biotypes ECH14 and ECH44, respectively.

Treatments for metabolization experiment were arranged in a factorial scheme; factor A corresponded to susceptible (S) biotypes (ECH14 from Pelotas and ECH44 from Rio Grande) and resistant (R) biotypes (ECH1 from Pelotas, ECH27 from Arroio Grande and ECH38 from Rio Grande) to imazapyr + imazapic; factor B consisted in application or not of the insecticide malathion or piperonyl butoxide (PBO), as inhibitors of cyt-P450 monooxygenases. Treatments were applied 20 days after sowing (DAS) when plants were in a three to four-leaf stage. Sixty minutes before the application of the herbicides (73.5 + 24.5 g a.e. ha⁻¹), malathion (1000 g a.i. ha⁻¹; grams of active ingredient per hectare) and PBO (525 g a.i. ha⁻¹) were sprayed to plants (Yu et al., 2009). Spraying was carried out in an open environment and after 24 hours they returned to the greenhouse to resemble field conditions, using a backpack sprayer delivering 140 l. ha⁻¹ at 210 kPa.

Table 1. Location and characterization of *Echinochloa crusgalli* (barnyardgrass) var. *mitis* in response to the application of imazapyr+imazapic (73.5+24.5 g a.e. ha⁻¹), visually assessed at 28 days after application. Capão do Leão/RS, Brazil.

Biotype (ECH)	Site	Coordinates		Response*
		Latitude	Longitude	
1-13	Pelotas- Corrientes	S 31°30'33"	W 52°10'45"	1
14-16	Pelotas- Corrientes	S 31°29'26"	W 52°10'55"	0
17-19	Capão do Leão- Granja da Palma	S 31°49'30"	W 52°28'50"	0
20-22	Capão do Leão- Granja da Palma/ETB	S 31°48'26"	W 52°25'22"	0
23-36	Arroio Grande- Barragem	S 32°18'27"	W 52°52'26"	1
37-39	Rio Grande- Granja 4 Irmãos	S 32°12'57"	W 52°30'09"	1
40-41	Rio Grande- Granja 4 Irmãos	S 32°11'24"	W 52°34'08"	1
42-43	Rio Grande- Granja 4 Irmãos	S 32°14'53"	W 52°35'26"	1
44-45	Rio Grande- Granja 4 Irmãos	S 32°16'54"	W 52°28'20"	0
46-48	Santa Vitória do Palmar- Arroito	S 33°38'31"	W 53°22'21"	1
49	Santa Vitória do Palmar- Hermenegildo	S 33°07'59"	W 53°12'38"	1

*Biotypes selected according to the response (visual) 0 = susceptible and 1 = resistant that exhibited the following responses to imazapyr+imazapic (73.5+24.5 g a.e. ha⁻¹): ECH1 (Biotype 1) = 10% control., ECH14 (Biotype 14) = 98% control; ECH27 (Biotype 27) = 10% control; ECH38 (Biotype 38) = 5% control and ECH 44 (Biotype 44) = 90% control.

Visual evaluations were done 14 and 28 DAT, and shoot dry mass was determined after collecting aerial part of the plants, drying in a forced air circulation oven at 60 °C and weighed 28 DAT. The control assessment was performed individually at each plant, using a percentage scale with severity score of phytotoxicity symptoms every 5%, where 0% (representing no effect of herbicides on plants) to 100% (plants total death).

Data obtained was analysed for normality and homoscedasticity, with posterior analysis of variance ($P \leq 0.05$). Duncan test ($P \leq 0.05$) was carried out using Assistance Assistat, version 7.7en.

Results

The significant interaction ($P \leq 0.05$) among studied factors for visual evaluation at 14 and 28 DAT (Table 2) and also for shoot dry mass (Table 3) was verified. At 14 DAT, it was observed that the control for the resistant biotype ECH1 was the same whether herbicides were applied with or without the inhibitors (Table 2). Also, inhibitors did not enhance control of ECH38. Herbicide control of ECH27 with addition of malathion and PBO was increased by 96% and 73%, respectively.

At 28 DAT, the results have further evidenced the action of inhibitors on plants (Table 2). Control treatment ECH1 was controlled by 78% with a previous application of either inhibitor, and was higher than the result obtained with

herbicide applied alone (40%). Similar results were observed for ECH27 whose control was enhanced by 68% and 70% for malathion and PBO, respectively and in contrast to the application of imazapyr+imazapic alone (38%). Susceptible biotypes (ECH14 and ECH44) were, as expected, controlled by almost 100% in all treatments. For the resistant biotype ECH38, application of the herbicide associated with the inhibitors did not provide satisfactory control, reaching a maximum control level of 25% 28 DAT. Visual assessment of control 28 DAT with malathion, exhibited a slight but significant enhancement compared to the herbicides alone (Table 2).

Shoot dry mass results (Table 3) presented significant dry matter reduction when the inhibitors preceded herbicide application compared to application of the herbicides alone on the resistant ECH1 and ECH27 biotypes.

Discussion

Resistant biotypes ECH1 and ECH27 presented a significant increase in the control by imazapyr + imazapic as observed when using the inhibitors malathion and PBO, possibly related to the blockage of cytochrome P450 activity, which is essential in the metabolism of several substances (Zhu et al., 2008). For *Echinochloa phyllopogon*, several genes related to multiple

Table 2. Control (%) at 14 and 28 days after application (DAA) of resistant (ECH1, ECH27 and ECH38) and susceptible (ECH14 and ECH44) *Echinochloa crusgalli* (barnyardgrass) var. *mitis* biotypes to the imazapyr+imazapic (73.5+24.5 g a.e. ha⁻¹), applied alone or preceded by the application of malathion (1000 g a.i. ha⁻¹) or PBO (525 g a.i. ha⁻¹). Capão do Leão/RS, Brazil.

Treatment	14 DAA				
	ECH1(R)	ECH14(S)	ECH27(R)	ECH38(R)	ECH44(S)
Control	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ca}	0.0 ^{Ca}	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ca}
Imazapyr+Imazapic	35.0 ^{Ab}	90.0 ^{Ba}	23.0 ^{Bb}	5.0 ^{Ac}	78.0 ^{Ba}
Imazapyr+Imazapic+Malathion	38.0 ^{Ac}	100.0 ^{Aa}	45.0 ^{Ac}	5.0 ^{Ad}	90.0 ^{Ab}
Imazapyr+Imazapic+PBO	40.0 ^{Ac}	98.0 ^{Ab}	40.0 ^{Ac}	0.0 ^{Bd}	85.0 ^{ABb}
Malathion	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ca}	0.0 ^{Ca}	0.0 ^{Ba}	0.0 ^{Ca}
PBO	0.0 ^{Bb}	2.0 ^{Ca}	0.0 ^{Cb}	0.0 ^{Bb}	0.0 ^{Cb}
C.V. (%)			19.19		
Treatment	28 DAA				
	ECH1(R)	ECH14(S)	ECH27(R)	ECH38(R)	ECH44(S)
Control	0.0 ^{Ca}	0.0 ^{Da}	0.0 ^{Ca}	0.0 ^{Da}	0.0 ^{Da}
Imazapyr+Imazapic	40.0 ^{Bb}	100.0 ^{Aa}	38.0 ^{Bb}	18.0 ^{Bc}	98.0 ^{Aa}
Imazapyr+Imazapic+Malathion	78.0 ^{Ab}	100.0 ^{Aa}	68.0 ^{Ac}	25.0 ^{Ad}	100.0 ^{Aa}
Imazapyr+Imazapic+PBO	78.0 ^{Ab}	100.0 ^{Aa}	70.0 ^{Ac}	21.0 ^{ABd}	93.0 ^{Ba}
Malathion	4.0 ^{Cab}	2.0 ^{Cab}	0.0 ^{Cb}	6.0 ^{Ca}	6.0 ^{Ca}
PBO	2.0 ^{Cb}	8.0 ^{Ba}	4.0 ^{Cb}	2.0 ^{Cdb}	7.0 ^{Cab}
C.V. (%)			10.92		

⁽¹⁾ Averages followed by the same capital letter in the column and lowercase in the row do not differ significantly by the Duncan test ($P \leq 0.05$).

Table 3. Shoot dry mass 28 days after application (DAA) of resistant (ECH1, ECH27 and ECH38) and susceptible (ECH14 and ECH44) *Echinochloa crusgalli* (barnyardgrass) var. *mitis* biotypes to the imazapyr+imazapic (73.5+24.5 g a.e. ha⁻¹), applied alone or preceded by the application of malathion (1000 g a.i. ha⁻¹) or PBO (525 g a.i. ha⁻¹, Capão do Leão/RS, Brazil).

Treatment	Shoot dry mass (g planta ⁻¹)				
	ECH1(R)	ECH14(S)	ECH27(R)	ECH38(R)	ECH44(S)
Control	4.08 ^{Ac}	4.98 ^{Aa}	4.91 ^{Aa}	4.26 ^{Bbc}	5.44 ^{Aab}
Imazapyr+Imazapic	2.07 ^{Bc}	0.11 ^{Dd}	2.71 ^{Cb}	3.46 ^{Ca}	0.24 ^{Dd}
Imazapyr+Imazapic+Malathion	0.73 ^{Cc}	0.07 ^{Dd}	1.84 ^{Db}	3.41 ^{Ca}	0.11 ^{Dd}
Imazapyr+Imazapic+PBO	0.79 ^{Cc}	0.08 ^{Dd}	1.67 ^{Db}	3.32 ^{Ca}	0.08 ^{Dd}
Malathion	3.74 ^{Ab}	4.58 ^{Ba}	5.09 ^{Aa}	3.55 ^{Cb}	4.72 ^{Ca}
PBO	4.47 ^{Aab}	3.51 ^{Cc}	4.04 ^{Bbc}	4.93 ^{Aab}	5.08 ^{Bb}
C.V. (%)			13.79		

⁽¹⁾ Averages followed by the same capital letter in the column and lowercase in the row do not differ significantly by the Duncan test ($P \leq 0.05$).

resistance involving the action of cytochrome P450 such as CYP71C35, CYP81A12, and CYP89B16, have been identified, which are highly expressed in resistant plants (Iwakami et al., 2018).

Resistant ECH1 initially did not exhibit increased control at 14 DAT from inhibitors action. It is possible that response may vary over time among plants subjected to the application of the inhibitors for certain herbicidal molecules (Yasuor et al., 2010), however, at 28 DAT, increased control was observed. For resistant biotype ECH38, application of herbicide and inhibitors did not present satisfactory control, reaching a maximum control level of 25% at 28 DAT (Table 2), which indicates that there is the possibility of another resistance mechanism present at this point, since for *E. crusgalli* the resistance to imazethapyr is partially reversed with the application of PBO or malathion at a dose of 1000 g a.i. ha⁻¹ for both (Dalazen et al., 2016). This dose was not applied in the study in question for PBO, but Dalazen et al. (2018) found that the gradual increase in the dose of the inhibitor does not increase control response for plants resistant to ALS by metabolism in barnyard grass.

According to Matzenbacher et al. (2015) resistance to imazethapyr in barnyard grass populations is associated with ALS mutations suggesting a change in the site of action as a resistance mechanism. This, together with previous identification of metabolism of herbicides by barnyard grass, indicates high complexity of herbicide resistance in this species. Other studies have found that such complexity significantly restricts the number of active ingredients that can be used effectively for control of this weed (Muthukumar et al., 2017; Dalazen et al., 2018). Eberhardt et al., (2016) evaluated the response of *E. crusgalli* to different herbicides in the state of Santa Catarina that had difficulties to be controlled with registered herbicides. The biotype showed cross resistance to the herbicide

imazapyr + imazapic and penoxsulon, both inhibitors of the ALS enzyme. However, it was also resistant to ACCase-inhibiting herbicides (cyhalofop-butyl (360 g a.i. ha⁻¹) and quinclorac (500 g a.i. ha⁻¹), thus characterizing multiple resistance.

In summary, two (ECH1 and ECH27) of the three biotypes resistant to the herbicides imazapyr + imazapic have shown resistance possibly due to enhanced metabolism. Similar results were found for *E. phyllopogon*, where the application of malathion followed by application of bispyribac-sodium to resistant plants, resulted in a decrease in shoot dry mass of up to 31% beyond the obtained without malathion, suggesting enhanced metabolic herbicide degradation contributed to this weed species resistance to herbicides (Fischer et al., 2000).

Resistance to herbicides caused by NTSR, mainly by the increase of metabolism of herbicides belonging to the class of imidazolinones is highly problematic due to the possibility of multiple resistance involving herbicides with other mechanisms of action. According to Bonow et al. (2018) resistant barnyard grass biotypes can be controlled with ACCase inhibitor herbicides such as cyhalofop-butyl and profloroxifen in irrigated rice; or by glyphosate in the case of rotation with soybean genetically modified for resistance to that herbicide (RR) and clethodim. However, ECH27 and ECH38 exhibit multiple resistance to quinclorac (Bonow et al., 2018), and no further control with this herbicide is possible in irrigated rice. Therefore, NTSR is a new challenge for the management of weeds such as barnyard grass, because it may involve resistance to other herbicides registered for irrigated rice.

The observed results reinforce the importance of the practice of the integrated management aiming at the sustainability of rice cropping. The sole dependence on chemical tools to control unwanted weeds has already proven not

viable (Abbas et al., 2017). Producers need to be aware that using herbicides with alternative mechanisms of action may be helpful, but repeated herbicide use may select for resistance in the future. It is essential to implement crop rotation enabling the use of different herbicides, practices to reduce seedbanks, and avoid new seed immigration in the field. This can be challenging, but prevention has always been and will be a cheaper and more effective way of managing and delaying the evolution of herbicide resistance (Abbas et al., 2017).

Conclusions

Biotypes of *E. crusgalli* var. *mitis* biotypes from Pelotas (ECH1) and Arroio Grande (ECH27) have evolved resistance to imazapyr + imazapic due to enhanced metabolism of the herbicides as suggested by the partial reversion of resistance using known P450 inhibitors. Resistance of the ECH38 biotype from Rio Grande may presumably involve a different resistance mechanism.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Department of Botany at the Federal University of Pelotas; for assistance in taxonomical identification of *Echinochloa crusgalli* biotypes.

References

- Abbas, T.; Zahir, A. Z.; Naveed, M.; Kremer, R. J. 2017. Limitations of Existing Weed Control Practices Necessitate Development of Alternative Techniques Based on Biological Approaches. *Advances in Agronomy*, 147(3), 239-280. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.10.005>
- Bonow, J. F. L.; Lamego, F. P.; Andres, A.; Avila, L. A.; Teló, G. M.; Egewarth, K. 2018. Resistance of *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* to imazapyr + imazapic herbicide and alternative control in irrigated rice. *Planta Daninha*, 36, e018168627. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100028>
- Brasil. 2009. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DC: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 398p. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf
- Dalazen, G.; Pisoni, A.; Rafaeli, R. S.; Merotto, A. 2018. Degradation Enhancement as the Mechanism of Resistance to Imazethapyr in Barnyard grass. *Planta Daninha*, 36, e018179504. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100119>
- Dalazen, G. 2016. *Expressão gênica associada à degradação de imazethapyr e efeito da temperatura e da concentração de CO2 em capim arroz*. Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. 150 p. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/150560>
- Délye, C.; Jasieniuk, M.; Le Corre, V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- Eberhardt, D. S.; Neto, A. M. O.; Noldin, J. A.; Vanti, R. M. 2016. Barnyard grass with Multiple Resistance to Synthetic Auxin, ALS and Accase Inhibitors. *Planta Daninha*, 34(4), 823-832. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582016340400023>
- Fischer, A. J.; Bayer, D. E.; Carriere, M. D.; Ateh, C. M.; Yim, K. O. 2000. Mechanisms of resistance to Bispyribac-Sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. *Pesticide Biochemistry*, 68(3), 156-165. <https://doi.org/10.1006/pest.2000.2511>
- Gorinova, N.; Nedkovska, M.; Atanassov, A. 2014. Cytochrome P450 Monooxygenases as a Tool for Metabolizing of Herbicides in Plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 19(3), 105-115. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817290>
- Hatzios, K. K.; Penner, D. 1982. *Metabolism of herbicides in higher plants*. CEPCO Division, Burgess Publishing Company. University of California. 142 p.
- Iwakami, S.; Kamidate, Y.; Yamaguchi, T.; Ishizaka, M.; Endo, M.; Suda, H.; Uchino, A.; Tominaga, T.; Matsumoto, H. 2018. CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytology*, 221(4), 2112-2122. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.15552>
- Köppen, V. and Geiger, R. 1930. *Handbuch der Klimatologie*, 5 Vols., Berlin: Gerbrüder Borntraegar. 44p. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Das_geographische_System_der_Klimate_\(1936\).pdf](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Das_geographische_System_der_Klimate_(1936).pdf)
- Matzenbacher, F. O.; Bortoly, E. D.; Kalsing, A.; Merotto, A. 2015. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. *The Journal of Agricultural Science*, 153(6) 1-15. <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859614000768>
- Molin, W. T.; Nandula, V. K.; Wright, A. A. and Bond, J. A. 2016. Transfer and Expression of ALS Inhibitor Resistance from Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* *A. palmeri* Hybrid. *Weed Science*, 64(2), 240-247. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00172.1>
- Muthukumar, V. B.; Norsworthy, J. K.; Smith, K. L.; Neve, P. 2017. Modeling the Simultaneous Evolution of Resistance to ALS and ACCase-Inhibiting Herbicides in Barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*) in Clearfield Rice. *Weed Technology*, 28(1), 89-103. <https://doi.org/10.1614/WT-D-13-00106.1>
- Ogliari, J.; Freitas, S. P.; Ramos, A. C.; Smith, R. E. B. 2009. Sistema primário de transporte de prótons integra os mecanismos de desintoxicação do mesotriome de milho. *Planta Daninha*, 27(4), 799-807. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582009000400018>

- Powles, S. B.; Yu, Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317-347. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Santos, H. G.; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C.; Oliveira, V. A.; Oliveira J. B.; Coelho, M. R.; Lumberras, J. F.; Cunha, T. J. F. 2013. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3a ed. Embrapa Solos. Rio de Janeiro. Brasil. 20p. <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00053080.pdf>
- SOSBAI-Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. 2018. *Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil*. Rio Grande do Sul, DC. Sosbai. 209 p. https://www.sosbai.com.br/uploads/documentos/recomendacoes-tecnicas-da-pesquisa-para-o-sul-do-brasil_906.pdf
- Soil Survey Staff. *Keys to soil taxonomy*. 2014. 12th ed. Washington, DC: USDA. 353 p. https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/class/taxonomy/?cid=nrcs142p2_053580
- Yasuor, H.; Zou, W.; Tolstikov, V. V.; Tjeerdema, R. S.; Fischer, A. J. 2010. Differential oxidative metabolism and 5-ketoclozoxone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clozoxone. *Plant physiology*, 153, 319-326. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153296>
- Yasuor, H.; Osuna, M. D.; Ortiz, A.; Saldain, N. E.; Eckert, J. W.; Fischer, A. J. 2009. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3653-3660. <https://doi.org/10.1021/jf8039999>
- Yu, Q.; Han, H.; Vila-Aiub, M. M.; Powles, S. B. 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 3925-3934. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq205>
- Yu, Q.; Abdallah, I.; Han, H.; Owen, M.; Powles, S. 2009. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Plant physiology*, 230, 713-723. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0981-8>
- Yu, Q.; Powles, S. 2014. Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production. *Plant physiology*, 166, 1106-1118. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242750>
- Yuan, J. S.; Tranel, P. J.; Stewart, C. N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, 12(1), 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.001>
- Zhang, Z.; Gua, T.; Zhao, B.; Yanga, X.; Peng, Q.; Li, Y.; Bai, L. 2017. Effects of common *Echinochloa* varieties on grain yield and grain quality of rice. *Field Crops Research*, 203, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.12.003>
- Zhu, J.; Patzoldt, W. L.; Shealy, R. T.; Vodkin, L. O.; Clough, S. J.; Tranel, P. J. 2008. Transcriptome response to glyphosate in sensitive and resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6355-6363. <https://doi.org/10.1021/jf801254e>

Respuesta agronómica de cuatro variedades de caña de azúcar en los Llanos Orientales de Colombia

Agronomic response of four sugarcane varieties in Eastern Plains of Colombia

Álvaro Rincón Castillo¹, Julio Jairo Becerra Campiño²

¹ Corporación colombiana de investigación agropecuaria – Agrosavia. ✉ arincon@agrosavia.co

² Corporación colombiana de investigación agropecuaria – Agrosavia. ✉ jbecerra@agrosavia.co

Rec.: 2018-02-27. Acep.: 2020-01-09

Resumen

En un Oxisol de los Llanos Orientales de Colombia se establecieron y evaluaron tres variedades de caña de azúcar Cenicaña Colombia (CC) (CC 8475, CC 833895, CC 8592) y una de República Dominicana (RD 7511) con el objeto de determinar la producción de biomasa y el área foliar. En un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, cada mes, entre los 7 y 11 meses de edad de cultivo, fueron evaluados el desarrollo agronómico, la producción de biomasa verde, la concentración de sacarosa y el área foliar. La producción total de biomasa (hoja + tallo) fue más alta ($P < 0.05$) en las variedades CC8475 y RD7511, con rendimientos de 110 y 106 t/ha, y 170 y 161 t/ha a 7 meses y 11 meses de edad de cultivo, respectivamente. Se encontró una alta correlación ($r^2 > 0.90$) entre el área foliar medida con planímetro y el producto obtenido de largo x ancho de la hoja en las cuatro variedades evaluadas. No se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre los promedios de área/tallo (6000 cm²) en las variedades. Los resultados obtenidos muestran que las variedades más productivas en la región fueron CC8475 y RD7511.

Palabras clave: Área foliar; Biomasa; Grados brix; Oxisol; Suelos ácidos.

Abstract

In an Oxisol in the Eastern Plains of Colombia, three varieties of sugar cane Cenicaña Colombia (CC) (CC 8475, CC 833895, CC 8592) and one from the Dominican Republic (RD 7511) were established and evaluated in order to determine the production biomass and leaf area. In a randomized complete block design with three replications, each month, between 7 and 11 months after sowing, agronomic development, green biomass production, sucrose concentration and leaf area were evaluated. The total biomass production (leaf + stem) was higher ($P < 0.05$) in CC8475 and RD7511 varieties, with yields of 110 and 106 t / ha, and 170 and 161 t / ha at 7 months and 11 months after sowing, respectively. A high correlation ($r^2 > 0.90$) was found between the leaf area measured with a planimeter and the product obtained in length x width of the leaf in the four varieties evaluated. No difference ($P > 0.05$) was found between the averages of area / stem (6000 cm²) in the varieties. The results obtained show that the most productive varieties in the region were CC8475 and RD7511.

Key words: Acid soils; Biomass; Brix degrees; Leaf area; Oxisol.

Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es altamente eficiente en la producción de biomasa por sus características de planta tipo C_4 , alta tasa de aprovechamiento de la energía solar y de fotosíntesis y tolerancia a la sequía (Salisbury y Ross, 1994). Estas propiedades la hacen una planta ideal para la generación de energía como bioetanol, producción de azúcar para la agroindustria y para consumo humano; además de sus posibles usos como planta forrajera para la alimentación de bovinos (Espinoza et al., 2006; Fernández et al., 2017; Giacomini et al., 2014).

La producción de biomasa está relacionada con la capacidad de la planta para tomar CO_2 y energía solar en el proceso de la fotosíntesis. El área foliar es una característica importante en el crecimiento de las plantas y determinante en la selección de variedades de caña de azúcar promisorias (Fernández et al., 2017). Se han desarrollado varios métodos para la determinación del área foliar en diferentes cultivos, incluyendo el uso de planímetros y la medición de largo x ancho de las hojas (Galindo y Clavijo, 2007). Estas mediciones han demostrado altos coeficientes de determinación ($r^2 > 0.70$) en cultivos como sorgo (Solórzano, 1976) y caña de azúcar (Oliveira et al., 2007; Brito et al., 2007). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el desempeño agronómico de tres variedades de caña de azúcar, Cenicaña Colombia y una de República Dominicana, en las condiciones de la región de Piedemonte de los Llanos Orientales de Colombia.

Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en Centro de Investigación La Libertad, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), ubicado en el municipio de Villavicencio, departamento del Meta, Colombia, a $4^{\circ}03.500'$ de latitud norte y $73^{\circ}28.152'$ de longitud oeste. La precipitación promedio anual, es de 2900 mm, con un periodo seco desde diciembre hasta finales de marzo. La temperatura promedio es de $26^{\circ}C$ y la humedad relativa de 85% en la época lluviosa y 65% en la época seca. El experimento se realizó entre julio de 2016 y junio de 2017. En la Figura 1 se presenta la precipitación en este periodo con respecto al registro de 30 años.

En el sitio experimental predominan Oxisoles de terraza alta con buen drenaje, franco arcillosos, caracterizados por su acidez, con saturación de aluminio de 60%. Los nutrientes más deficientes son fósforo (3.5 mg/kg), azufre (4.5 mg/kg), calcio (0.8 cmol/kg) y magnesio (0.3 cmol/kg) (Tabla 1).

Las variedades de caña de azúcar evaluadas fueron Cenicaña (CC) 8475, 833895, y 8592 y República Dominicana (RD) 7511. La preparación del suelo se hizo con un pase de arado cincel rígido más un pase de rastra. Antes de la siembra se aplicaron a voleo con encaladora una mezcla de 2 t/ha de cal dolomítica y 1 t/ha de escorias Thomas. Estas enmiendas fueron incorporadas en el suelo con un pase de rastra antes de un pase de rastrillo pulidor para dejar el suelo en buenas condiciones para la siembra. Cuarenta y cinco días después de aplicadas las enmiendas se realizó un control de malezas mediante la aplicación de 2 l/ha de glifosato y a continuación se hizo la siembra en surcos separados 1.20 m entre sí. El material de siembra utilizado consistió en trozos de tallo de caña con tres yemas, desinfectados previamente con 50 g de Mancozeb y 50 cc de Furadan-50 disueltos en 20 litros de agua. En el primer mes de establecimiento se realizó control manual de malezas y no se realizó control de plagas ni enfermedades. En el momento de la siembra se aplicaron 150 kg/ha de fosfato diamonio (67 Kg de P_2O_5 , 27 de N), 150 kg/ha de cloruro de potasio (90 kg de K_2O) y 150 kg/ha de kieserita (21 kg de Mg y 30 kg de S). Finalmente, se aplicaron 100 kg/ha de urea (46 kg N) divididos en dos aplicaciones a los 2 y 4 meses de edad del cultivo.

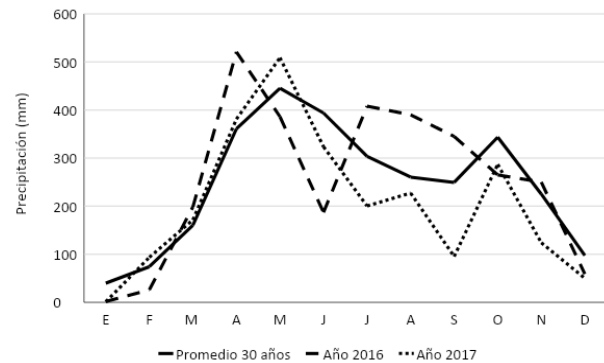


Figura 1. Precipitación durante 2016 y 2017 y promedio de 30 años. C.I. la Libertad, Piedemonte de los Llanos Orientales de Colombia.

Tabla 1. Características químicas del suelo (Oxisol) en el sitio experimental. Villavicencio, Colombia.

Característica	Valor	Característica	Valor
pH	4.9	Na (cmol/kg)	0.1
M.O. (%)	3.0	Fe (mg/kg)	42.0
P (mg/kg)	3.5	B (mg/kg)	0.3
S (mg/kg)	4.5	Cu (mg/kg)	0.6
Al (cmol/kg)	2.0	Mn (mg/kg)	10.0
Ca (cmol/kg)	0.8	Zn (mg/kg)	1.2
Mg (cmol/kg)	0.3	Saturación de Al (%)	60.0
K (cmol/kg)	0.1		

Las evaluaciones de producción de biomasa de planta y sólidos totales se realizaron mensualmente, desde los 7 hasta los 11 meses de edad del cultivo. Para ello se cosechó un surco central de 10 m, dejando dos surcos de cada borde de la parcela. En cada corte fueron evaluadas las variables: altura de planta (m), número de tallos (tallos/surco en 10 m de cultivo), longitud de tallos (m), longitud del entrenudo (cm), diámetro de tallo (mm), producción de tallos (t/ha), producción de hojas (t/ha), materia seca de hojas (%).

La concentración de azúcares mediante los sólidos totales (°brix) presentes en el jugo de la caña se determinó con un refractómetro digital Pal-1, en el cuarto entrenudo hacia arriba desde la base del tallo y en el cuarto entrenudo hacia abajo desde la parte apical. El índice de madurez se obtuvo relacionando los grados brix de la parte apical con los grados brix de la base del tallo (Ramírez et al., 2014). Este índice fue tomado como base para determinar cuándo la planta estaba en condiciones óptimas de madurez para cosecha, que de acuerdo con Oliva et al. (2017) y Mequanent (2016) debe ser de 0.95. El área foliar fue medida a 8 meses de edad del cultivo en todas las hojas de 10 tallos de cada variedad. Esta medición se realizó por dos métodos: con un planímetro CI -203 CA- CID Inc. y midiendo el área como producto del largo x el ancho. Los pares de datos resultantes para cada hoja se sometieron a un análisis de regresión para determinar la relación entre ellos, para lo cual se utilizó un modelo lineal simple, tomando como base varios estudios realizados en otras gramíneas como sorgo (Solórzano, 1976), caña de azúcar (Oliveira et al., 2007), maíz (Razquin et al., 2017) *Brachiaria plantaginea* (Bianco, 2005), y algunas gramíneas forrajeras tropicales (Sousa et al., 2015). El modelo propuesto fue: $y = bo + b1X$, donde y = área foliar, bo = intercepto, $b1$ = coeficiente de regresión, X = Largo * Ancho de la hoja.

Los datos fueron procesados estadísticamente a través de análisis de regresiones simples mediante el programa SAS, utilizando el área foliar promedio en el planímetro como variable dependiente y y el producto de largo * ancho de la hoja como variable independiente X .

El experimento se estableció en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. El área de cada unidad experimental fue de 120 m² (10 m x 12 m) y consistió en 10 surcos con una longitud de 10 m.

Los datos de los indicadores agronómicos fueron analizados con el programa estadístico SAS, con análisis de varianza y comparación de medias por medio de la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados

Desarrollo de la planta

A las edades de 7 y 10 meses, la variedad CC8475 presentó el mayor número de tallos/planta ($P < 0.05$). A los 11 meses de edad, esta variedad y las variedades CC8592 y RD7511 presentaron valores altos y similares de esta característica. La variedad RD7511 tuvo la mayor cantidad de nudos en tallo, lo que indica un mayor número de puntos de anclaje de raíces y de emisión de yemas en la etapa de siembra y establecimiento; no obstante, los entrenudos o sitios de acumulación de azúcares fueron más cortos. La variedad RD7511 presentó la mayor altura de planta y la CC833895 fue la variedad más baja (Tabla 2). El diámetro del tallo no presentó diferencias ($P > 0.05$) entre variedades.

Tabla 2. Desarrollo agronómico en Oxisoles de variedades de caña de azúcar entre 7 y 11 meses de edad. Villavicencio, Colombia.

Variedad	Edad (mes)	Tallos (no./10 m)	Nudos (no./tallo)	Altura (m)	Diámetro tallo (cm)
CC833895	7	43.0 c*	20.2 b	1.6 b	2.9
CC8475		59.5 a	20.6 b	2.1 a	2.8
CC8592		43.7 c	19.8 b	2.1 a	2.8
RD7511		49.2 b	22.7 a	2.4 a	2.9
Sig.		0.003	0.051	0.018	NS
C.V.		10.9	6.8	10	6.5
CC833895	8	43.2	20.1 ab	1.9 c	2.9 ab
CC8475		60.5	20.8 ab	2.4 b	2.9 ab
CC8592		45.7	19.7 b	2.3 b	2.8 b
RD7511		50.0	22.6 a	2.8 a	3.0 a
Sig.		NS	0.071	0.008	0.017
C.V.		24.2	7.5	6.6	5.6
CC833895	9	44.5	23.8 b	2.1 b	3.0
CC8475		62.2	23.4 b	2.7 a	3.0
CC8592		47.2	21.8 b	2.9 a	2.9
RD7511		52.5	27.0 a	3.1 a	3.0
Sig.		NS	0.044	0.001	NS
C.V.		29.1	7.4	6.6	5.6
CC833895	10	45.2 b	27.9	2.4 c	3.0
CC8475		62.5 a	24.9	2.9 b	3.0
CC8592		48.7 b	26.8	3.1 b	2.9
RD7511		52.5 b	28.7	3.6 a	3.0
Sig.		0.048	NS	0.005	NS
C.V.		18.5	10.1	6.3	6.8
CC833895	11	44.5 b	28.1 ab	2.7 c	3.0
CC8475		66.7 a	25.8 b	3.1 b	3.0
CC8592		49.7 a	27.1 ab	3.3 b	3.0
RD7511		56.6 a	30.3 a	3.9 a	3.1
Sig.		0.002	0.01	0.001	NS
C.V.		11.9	7.9	7.8	5.1

*Promedios con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey.

Producción de biomasa aérea y concentración de azúcar (°brix)

Las variedades de caña de azúcar estudiadas se caracterizaron por producir buena cantidad de tallos y hojas en los periodos de evaluación. La producción promedio de tallos aumentó de 76 t/ha a la edad de 7 meses hasta 109 t/ha a los 11 meses. No obstante, a los 10 meses de edad las variedades CC8475 y la RD7511 produjeron más biomasa ($P < 0.05$) que las variedades CC8592 y CC833895. La proporción de hojas de las variedades varió entre 25 y 29% y fue más alta en las variedades CC8475 y RD7511 pasando de 25 t/ha a los 7 meses a 39 t/ha a los 9 meses de edad (Tabla 3). La producción total de biomasa (hoja + tallo) a los 7 meses de edad de cultivo fue más alta ($P < 0.05$) en las variedades CC8475 (110 t/ha) y RD7511 (106 t/ha), no obstante, esta diferencia desapareció a los 11 meses de edad, con un promedio de 152 t/ha.

Tabla 3. Producción de biomasa (materia verde -MV) de variedades de caña de azúcar entre 7 y 11 meses de edad. Villavicencio, Colombia.

Variedad	Edad (mes)	Hoja (t/ha)	Tallo (t/ha)	Biomasa total (MV, t/ha)
CC833895	7	19.0 b*	70.8	89.8 b
CC8475		29.9 a	80.5	110.4 a
CC8592		29.5 a	69.1	98.6 a
RD7511		22.9 ab	83.1	106.0 a
Sig.		0.051	NS	0.037
C.V.		20.1	17.2	10.6
CC833895	8	24.1 b	70.1	94.2 c
CC8475		38.3 a	86.6	124.9 a
CC8592		32.5 ab	72.1	104.2 b
RD7511		31.3 ab	83.7	115.0 a
Sig.		0.034	NS	0.003
C.V.		23.2	14.7	15.4
CC833895	9	24.0 b	72.9	96.9 b
CC8475		39.6 ab	109.3	148.9 a
CC8592		43.7 a	97.4	141.1 a
RD7511		46.7 a	107.5	154.2 a
Sig.		0.176	NS	NS
C.V.		28.1	29.5	23.7
CC833895	10	31.9 c	74.6 c	106.5 c
CC8475		43.4 ab	112.4 a	155.8 a
CC8592		33.7 bc	106.3 b	140.0 b
RD7511		47.5 a	110.2 a	157.7 a
Sig.		0.072	0.019	0.029
C.V.		16.9	16.8	16.1
CC833895	11	27.5 c	76.9	124.4
CC8475		47.7 a	122.1	169.8
CC8592		34.4 bc	117.2	151.6
RD7511		43.3 ab	118.1	161.4
Sig.		0.048	NS	NS
C.V.		19.5	27.9	24.4

*Promedios con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey.

A los 7 meses de edad de cultivo la concentración promedio de azúcar en las variedades fue de 19 °brix en la base del tallo y de 15.7 °brix en la parte superior, con alta concentración (22 °brix) a los 8 meses. Al comienzo de la época de lluvias (abril), que coincidió con el noveno mes después de la siembra, las variedades Cenicaña presentaron una concentración de azúcar (20 °brix) con una mejor distribución a lo largo del tallo, con un índice de cosecha entre 0.99 y 0.92. Durante los meses lluviosos de mayo y junio, cuando la caña tenía una edad de 10 y 11 meses, respectivamente, la concentración de azúcar en la base del tallo permaneció estable en 19 °brix, sin embargo, en la parte superior del tallo los grados brix se redujeron a 16, con un índice de madurez de 0.83, cercano al valor que presentó la caña de azúcar a la edad de 7 meses (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de sacarosa (°brix) de variedades de caña de azúcar entre 7 y 11 meses de edad. Villavicencio, Colombia.

Variedad	Edad (mes)	°Brix tercio inferior del tallo	°Brix tercio superior del tallo	Índice de madurez
CC833895	7	18.2	15.6	0.86
CC8475		19.5	15.0	0.77
CC8592		19.6	16.1	0.82
RD7511		18.8	16.1	0.86
Prob. (%)		NS	NS	NS
C.V.		5.8	10.5	13.4
CC833895	8	19.8 b*	18.9 a	0.95
CC8475		22.1 a	16.2 b	0.73
CC8592		21.9 a	18.1 ab	0.83
RD7511		19.8 b	18.9 a	0.95
Prob. (%)		0.025	0.056	NS
C.V.		4.8	8.2	8.3
CC833895	9	20.9 a	20.6 a	0.99 a
CC8475		19.9 ab	18.3 ab	0.92 a
CC8592		20.5 ab	19.0 ab	0.93 a
RD7511		19.5 b	17.1 b	0.88 b
Prob. (%)		0.014	0.080	0.002
C.V.		3.3	7.9	8.2
CC833895	10	20.0 a	16.7	0.84
CC8475		18.8 ab	16.1	0.86
CC8592		20.2 a	17.5	0.87
RD7511		17.7 b	15.2	0.86
Prob. (%)		0.033	NS	NS
C.V.		5.1	10.1	10.3
CC833895	11	20.1	17.3	0.86
CC8475		19.1	15.2	0.79
CC8592		19.6	17.6	0.90
RD7511		17.9	14.1	0.79
Prob. (%)		NS	NS	NS
C.V.		7.9	14.1	11.4

*Promedios con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey

La mayor concentración de azúcares se presentó a final de la época seca en abril en promedio de 18.7 °brix, mientras que en los meses lluviosos este valor se redujo a 16.2 °brix.

Área foliar

Con el fin de establecer un método sencillo para medir el área foliar, se desarrollaron ecuaciones de regresión con los datos de las variedades de caña evaluadas (Tabla 5). Se encontró alta correlación entre el área foliar medida en el planímetro y el producto obtenido del largo x ancho de la hoja, lo que fue confirmado por el alto valor de determinación ($r^2 > 90$) obtenido. Por tanto, la medida largo x ancho de hoja es válida para medir el área foliar de las variedades de caña en estudio. El número de hojas/tallo fue mayor ($P < 0.05$) en las variedades RD7511 y CC8475 con 12 y 11 hojas, respectivamente, no obstante, el área de hoja fue mayor ($P < 0.05$) en las variedades CC8592 (696 cm²) y CC833895 (632 cm²). Con base en estos resultados, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el área foliar/tallo en las cuatro variedades, con valores entre 5151 cm² y 6602 cm² (Tabla 6). A la edad de 8 meses de cultivo la relación área foliar:área de suelo fue de 3:1, lo cual indica un IAF promedio de 3 para las variedades evaluadas.

Tabla 5. Ecuaciones de regresión entre área foliar vs. largo x ancho de hojas de variedades de caña de azúcar. Villavicencio, Colombia.

Variedad de caña	Ecuación de regresión	Coefficiente de determinación (r^2)
CC8475	$y = 0.6114x - 4.96$	0.93
CC8592	$y = 0.6096x + 35.64$	0.96
CC833895	$y = 0.6604x - 17.4$	0.92
RD 7511	$y = 0.6927x - 30.821$	0.97

y = variable dependiente (área foliar medida en el planímetro). x = variable independiente (producto de largo x ancho de las hojas).

Tabla 6. Área foliar de variedades de caña de azúcar, a los 8 meses de edad. Villavicencio, Colombia.

Material	Hojas/tallo (no.)	Área foliar (cm ² /hoja)	Área/tallo (cm ²)
CC8475	11.1 ab*	592.5 b	6602
CC8592	9.0 c	696.6 a	5151
CC833895	10.2 bc	631.8 ab	6448
RD7511	12.1 a	488.2 c	5813
Significancia	0.0004	0.0001	NS
C.V. (%)	14.5	11	16.4

*Promedios con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey.

Discusión

Las variedades de caña de azúcar CC8475 y RD7511 sobresalieron por presentar la más alta producción de biomasa durante las evaluaciones, lo que fue debido a la mayor producción de tallos y altura de planta. Esto confirma lo encontrado por Rincón (2005) evaluando 10 variedades de caña, donde sobresalió CC8475 con un promedio de 86 t/ha durante 2 años en las mismas condiciones del presente estudio. La alta producción de biomasa verde encontrada en las variedades CC8475 y RD7511 (170 y 161 t/ha a 11 meses de edad de cultivo, respectivamente) son una alternativa importante para la alimentación de bovinos en épocas críticas (Rincón, 2005) y para la producción de bioetanol (Flórez - Pardo et al., 2019) por el alto contenido de holocelulosa encontrada en la variedad CC8475

En condiciones tropicales la temperatura tiene su mayor efecto sobre la calidad del jugo de la caña de azúcar en los periodos secos, cuando las diferencias entre temperaturas máxima y mínima oscila entre 11 y 12 °C, lo cual estimula el almacenamiento de sacarosa (Amaya et al., 1995). En la época lluviosa esta oscilación es menor y los rendimientos de azúcar se reducen (Larrañondo y Villegas, 1995; Larrañondo, 1995). Esto se confirmó en las evaluaciones de concentración de azúcar realizadas en este experimento.

La concentración de azúcar en las variedades evaluadas se puede considerar alta, si se compara con los valores encontrados por Larrañondo (1995) (10 - 16 °brix) y similar a los obtenidos por Ramírez et al. (2014) (17 - 20 °brix). Los altos valores °brix (15 - 19 en época de lluvia y 17 - 20 en época seca) en este estudio, están relacionados con los promedios de temperatura mínima en (21 °C) y máxima de 30°C de la zona.

Los resultados de área foliar en este estudio fueron similares a los encontrados por Oliveira et al. (2007) y Brito et al. (2007) y muestran la validez del producto ancho x largo de hoja para esta medición. La caña de azúcar es una planta C4 con alta capacidad para utilizar carbono en la fabricación de carbohidratos. Las variedades CC8475 y RD7511 presentaron, respectivamente, 11 y 12 hojas/tallo lo que favorece una alta capacidad fotosintética. Aunque las demás variedades en estudio presentaron menor número de hojas, éstas tuvieron una mayor área foliar lo cual asegura su adecuada capacidad de fotosíntesis y un IAF de 3, inferior al encontrado en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca, donde el IAF varía entre ente 4 y 7 en cultivos de 8 meses de edad a cosecha (Amaya et al., 1995).

Por otra parte, las variedades Cenicaña Colombia (CC) en el Valle del Cauca presentan, en promedio, un área foliar de 850 cm² (Amaya et al., 1995), siendo mayor que el máximo valor (700 cm²) encontrado en este estudio con la variedad CC8592, esta diferencia está relacionada con la baja fertilidad del Oxisol de los Llanos Orientales vs. la alta fertilidad de los Vertisoles y Molisoles predominantes en el Valle del Cauca; además de la diferencia en horas de brillo solar entre ambas regiones. No obstante, estas limitaciones, el rendimiento de 150 t/ha de caña a 10 meses de cosecha se puede considerar alto para las condiciones de los Llanos Orientales.

Conclusiones

Por su buen desarrollo vegetativo y alta producción de biomasa total, las variedades Cenicaña CC8475 y Republica Dominicana RD7511 aparecen como promisorias en la región del Piedemonte de los Llanos Orientales de Colombia. Las variedades evaluadas presentaron buena concentración de azúcares con alta correlación ($r^2 > 0.90$) entre el área foliar medida con planímetro y el producto obtenido de largo x ancho de la hoja. El área foliar determinada midiendo el largo x ancho de la hoja presentó una buena relación y un alto coeficiente de determinación cuando se comparó con el uso de equipos o planímetros.

Agradecimiento

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural del Colombia (MADR) por la financiación de la presente investigación.

Referencias

- Amaya, E.A.; Cock, J.H., Hernández, A.; Irvine, J. 1995. *Biología*. p. 31-62. En: *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. Cenicaña, Cali. 365 p. https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seriadados/libro_el_cultivo_cana/libro_p3-394.pdf
- Bianco, S.; Pitelli, R.A.; Bianco, M.S. 2005. Estimativa da área foliar de *Brachiaria plantaginea* usando dimensões lineares do limbo foliar. *Planta daninha*, 23 (4), 597-601. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582005000400006>
- Brito, E.; Romero, E.R.; Casen, S.D.; Alonso, L.G.; Digonzelli, P.A. 2007. Métodos no destructivos de estimación del área foliar por tallo en la variedad LCP 85-384 de caña de azúcar. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán*, 84(2), 29-32. https://www.researchgate.net/publication/262546979_Metodos_no_destructivos_de_estimacion_del_area_foliar_por_tallo_en_la_variedad_LCP_85-384_de_cana_de_azucar
- Espinoza, F.; Argenti, P.; Carrillo, C.; Araque, C.; Torres, A.; Valle, A. 2006. Uso estratégico de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en novillas mestizas gestantes. *Zootecnia Tropical*, 24(2), 95-107. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692006000200001
- Fernández, Y.; Pedraza, R.; Hermida, Y.; Llanes, A.; Torres, I.; Montalvan J.; Noy, A. 2017. Indicadores de crecimiento de una población de 48 clones de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con valor forrajero. *AGRISOST*, 22 (3), 17-28. <https://doaj.org/1945f4946834cd8149f367?frbrVersion=2>
- Flórez-Pardo, L.M; González-Córdoba, A.; López-Galán, J.E. 2019. Characterization of hemicelluloses from leaves and tops of the CC 8475, CC 8592 and V 7151 varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *DYNA*, 86(210), 98-107. <http://doi.org/10.15446/dyna.v86n210.75757>
- Galindo, J.R. y Clavijo, J. 2007. Modelos alométricos para estimar el área de los folíolos de arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8 (1), 37-43. https://doi.org/10.21930/rcta.vol8_num1_art:81
- Giacomini, A. A.; Batista, K.; de Andrade, J.B.; Pereira, M.L.; Gerdes, L.; Teixeira, W.; Pozar, I.; Colozza, M.T.; Ferrari, E. 2014. Potencial de cana de açúcar sucroalcooleira para alimentação de ruminantes ao longo do ciclo da cultura. *Boletim De Indústria Animal*, 71(1), 8-17. <https://doi.org/10.17523/bia.v71n1p8>
- Larrahondo, J.E. y Villegas, F. 1995. *Control y características de maduración*. p. 297-313. En: *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. Cenicaña, Cali. 365 p. https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seriadados/libro_el_cultivo_cana/libro_p3-394.pdf
- Larrahondo, J.E. 1995. Calidad de la caña de azúcar. En: *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. Cenicaña, Cali. p. 337-354.
- Mequanent, Y. 2016. The effect of harvest age on maturity indices of quality parameters of sugar cane varieties at Metahara Sugar State in Cool Season. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3(4), 205-210. <http://s-o-i.org/1.15/ijarbs-2016-3-4-29>
- Oliva, C. J.; Oliva, V. M.; García, J. 2017. Selección fenotípica de tres variedades élites de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) para la producción de panela granulada en la provincia de Bongará (Región Amazonas). *Rev. de investig. agroproducción sustentable*. 1(1), 80-86. <http://dx.doi.org/10.25127/aps.20171.355>
- Oliveira, R. A.; Daros, E.; Camargo, J. L.; Weber, H.; Teruyo, O.; Besspalhok-Filho, J. C.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Tramuja da Silva, D. K. 2007. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 37(2), 71-76. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=253020281002>
- Ramírez, J.; Insuasty, O.; Viveros C.A. 2014. Comportamiento agroindustrial de diez variedades de caña de azúcar para producción de panela en Santander, Colombia. *Revista Cienc. Tecnol. Agropecu.* 15(2), 183-195. https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num2_art:358
- Rincón, A. 2005. Evaluación agronómica y nutricional de variedades de caña de azúcar con potencial forrajero en el Piedemonte llanero. *Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 6(2), 60-68. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945019007>
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. 1994. *Fisiología vegetal*. Ed. Iberoamérica S.A. México. 759 p.
- Solórzano P.R. 1976. Determinación de área foliar en sorgo granero (*Sorghum bicolor* L. moench) a diferentes edades. *Agronomía Tropical*. 26(1), 39-45. <http://www.idalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=orton.formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=021650>
- Sousa, L.F.; Santos, J.G.D.; Alexandrino, E.; Maurício, R.M.; Martins, A.D.; Sousa, J.T.L. 2015. Método prático e eficiente para estimar a área foliar de gramíneas forrageiras tropicais. *Arch. Zootec.* 64 (245): 83-85. <https://doi.org/10.21071/az.v64i245.380>

Postharvest quality of tomato as affected by nitrogen and sulfur interaction

Calidad poscosecha del tomate afectada por la interacción de nitrógeno y azufre

Matias Siueia Júnior ¹, Maria Ligia de Souza Silva ², Anderson Ricardo Trevizam ³,
Valdemar Faquin ⁴, Deivisson Ferreira da Silva ⁵.

¹ Aquila University, College of Agricultural Sciences, Mozambique. ✉ siueia.junior@gmail.com

² Federal University of Lavras, Department of Soil Science, Brasil. ✉ marialigia.silva@ufla.br

³ Federal University of Lavras, Brasil. ✉ aanrt@hotmail.com

⁴ Federal University of Lavras, Brasil. ✉ vafaquin@ufla.br

⁵ Federal Institute Catarinense, Brasil. ✉ deivisson.silva@ifc.edu.br

Rec.: 15-08-2018 Acep.: 17-02-2020

Abstract

Nitrogen (N) and sulfur (S) are nutrients that, in addition to influencing plant growth and production, interfere with processes related to postharvest fruit quality. In the present study, N x S interaction was evaluated in the postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The experiment was conducted in a greenhouse using 5 dm³ capacity vessels containing a 0-20 cm layer of a dystropherric Red Latosol. A 5 x 3 factorial design was used, with combinations of five doses of N (0, 100, 200, 300 and 400 mg dm⁻³) and three doses of S (0, 60 and 120 mg dm⁻³) distributed in a completely randomized design, with four repetitions. After harvest, the attributes of fruit quality were evaluated: firmness, pH, soluble solids (SS), titratable acidity (AT), soluble solids ratio and titratable acidity (SS / AT), vitamin C, lycopene and beta-carotene. An increase in firmness was observed, as well as the content of soluble solids, titratable acidity and the SS / AT ratio of the fruits as a result of the interaction N x S. However, this interaction favoured the reduction of the contents of vitamin C, lycopene and beta-carotene, and the quality characteristics of tomato fruit in relation to the recommended values. Only the increasing doses of N favoured a higher pH in the tomato fruits.

Keywords: Lycopene; Physicochemical quality; *Solanum lycopersicum* L.; Soluble solids; Titratable acidity; Vitamin C.

Resumen

El nitrógeno (N) y el azufre (S) son nutrientes, que además de influir en el crecimiento y producción de las plantas, interfieren en procesos relacionados con la calidad del fruto poscosecha. En el presente estudio se evaluó interacción N x S en la calidad poscosecha de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). El experimento fue conducido en invernadero utilizando vasos de 5 dm³ de capacidad que contenían una capa de 0-20 cm de un Latosol Rojo distroférico. Se utilizó un diseño factorial 5 x 3, con combinaciones de cinco dosis de N (0, 100, 200, 300 y 400 mg dm⁻³) y de tres de S (0, 60 y 120 mg dm⁻³) distribuidas en un diseño completamente aleatorio, con cuatro repeticiones. Después de la cosecha se evaluaron los atributos de la calidad del fruto: firmeza, pH, sólidos solubles (SS), acidez titulable (AT), relación sólidos solubles y acidez titulable (SS/AT), vitamina C, licopeno y betacaroteno. Se observó un aumento de la firmeza, así como del contenido de sólidos solubles, acidez titulable y la relación SS/AT de los frutos como resultado la interacción N x S. No obstante esta interacción favoreció la reducción de los contenidos de vitamina C, licopeno y betacaroteno, y las características de calidad de fruto del tomate en relación con los valores recomendados. Sólo las dosis crecientes de N favorecieron un mayor pH en los frutos de tomate.

Palabras clave: Acidez titulable; Calidad fisicoquímica; Licopeno; *Solanum lycopersicum* L.; Sólidos solubles; Vitamina C.

Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is considered one of the most cultivated vegetables in the world (Faostat, 2019), while Brazil is the tenth largest producer of table tomatoes with nearly of 4.1 million tonnes planted in an area of 57.134 thousand hectares (Faostat, 2019). Fertilization is considered one of the most important factors to maximize tomato production, since this vegetable is very demanding in terms of nutrition, mainly by nitrogenated fertilizers can increase the productivity and quality of the fruit (Bastos et al., 2013). Recently, nitrogen (N) fertilizer applications have increased considerably; the optimum N rate range for tomato production is 110 to 150 kg ha⁻¹ (Malavolta, 1981).

Nitrogen fertilization increases the concentration of some volatile compounds, titratable acidity, soluble sugars and soluble solids, however, decreases firmness and vitamin C content in tomato fruits (Bénard et al., 2009; Kuscu et al., 2014), while the application of S increases the concentration of lycopene and overall production (Zelená et al., 2009; Silva et al., 2014). In plants, N is in the form of proteins, and S is a constituent of two essential amino acids, cysteine and methionine. In the case of deficiency of these elements, there will be a decrease in the production of these amino acids and the proteins containing them will not be formed, allowing the plant metabolism to be modified according to the N-form combined with the S in the fertilization (Marschner, 2012). However, both N and S, may present synergism and to some extent influence fruit production, maturation and quality (Marschner, 2012).

Within this context, Silva et al. (2014) verified that the N/S ratio decreases with application of S in the tomato, also noticing that the balance between N and S is important, because higher rates of one nutrient can lead to less availability of the other to the plants, growth, yield and post-harvest quality of the crop. Due to studies scarcity on sulphate fertilization in tomato, the present work aimed to evaluate the interaction between N and S in tomato fruit quality.

Material and methods

The experiment was carried out under greenhouse conditions from July to December 2015 at the Department of Soil Science, Federal University of Lavras, Lavras-MG (latitude 21 ° 14 '43 South and longitude 44 ° 59' 59 West, and altitude of 919 m), in pots containing 5 dm³ of soil, filled with samples of the 0-20 cm layer of a soil characterized as Anionic Acrudox, according to the Soil Survey Staff (2014). Physicochemical

soil properties were: sand = 160 g kg⁻¹; Silt = 150 g kg⁻¹; Clay = 690 g kg⁻¹; pH in water = 5.0; organic matter = 28.7 g kg⁻¹; P (Mehlich-1) = 1.1 mg dm⁻³; K = 54 mg dm⁻³; Ca = 1.5 cmol dm⁻³; Mg = 0.2 cmol dm⁻³; Al = 0.4 cmol dm⁻³; H + Al = 6.3 cmol dm⁻³; B = 0.3 mg dm⁻³; Cu = 2.5 mg dm⁻³; Fe = 28.0 mg dm⁻³; Zn = 0.4 mg dm⁻³; S = 11.7 mg dm⁻³; Mn = 17.5 mg dm⁻³; CEC at pH 7 = 8.1 cmol dm⁻³; Base Saturation = 22%.

The experimental was a completely randomized design with two factors: (1) nitrogen dose factor with five levels (100, 200, 300 and 400 mg dm⁻³), in the form of urea and two sulphur dose factor with three levels: 0, 60 and 120 mg dm⁻³, in the form of calcium sulphate (agricultural gypsum), with four replicates, for a total of 60 plots.

Based on the soil chemical analysis, liming was carried out to raise the saturation by bases to 80%, using limestone filler (PRNT = 99%). After soil incubation for 30 days, with humidity close to 60% of the total volume of pores (VTP), basic fertilization was carried out with the application of S rates, according to treatments, via soil in a single application, and 1463 mg dm⁻³ of P, as triple superphosphate, 689.65 mg dm⁻³ of K as potassium chloride, and Ca at the concentration of 6 g L⁻¹, in the form of calcium chloride. Each vessel received a tomato seedling, *Angelim* cultivar, from the hybrid saladete group with a determined growth habit. The rates of N were applied in cover, divided in four times at 10, 40, 70, and 100 days after transplantation (DAT), in solution form. Together with the rates of N, 75 mg of K per pot was applied. A solution containing 2 g L⁻¹ of B was applied via the leaf from the beginning of the flowering biweekly in the form of boric acid.

Plants were tutored by means of cuttings with approximately 1.5 m of height and the plants tied with chains. From 20 DAT, weekly sprouting was carried out, for the conduction of a single rod. The Irrigation was performed by drip irrigation and its management was carried out by controlling soil water content. Phytosanitary control was carried out by means of the spraying of acaricides and fungicides when necessary, according to the recommendations of the integrated pest and disease management for the tomato crop.

Fruits were harvested manually and weekly from 120 days after planting, in the breaker stage, characterized by the breaking of the green fruit stage with the appearance of slightly yellowish or reddish patches on the region of the scar. Harvested fruits were packed in plastic bags along the production cycle and packaged in a cold camera.

At the end of the experiment, fruits were assessed for (1) firmness using a manual

penetrometer (Mc-Cormik model) at two points equidistant in the equatorial portion of each fruit, obtaining the values in Newton (N) before Freezing; (2) soluble solids content (SS), which was obtained by direct reading in bench refractometer (Optech brand RMT model), using homogenized pulp and filtered at room temperature, obtaining values in °Brix; (3) the titratable acidity (TA) determined by the titration method as described by (IAL, 2005); (4) SS/TA ratio obtained by the ratio between soluble solids and titratable acidity; (5) pH of the pulp with pH meter (brand TECNAL); (6) beta carotene and lycopene content, obtained by spectrophotometric analysis according to the methodology described in Rodriguez-Amaya (2001) and (7) vitamin C content, obtained by the colorimetric method using 2,4-dinitrophenylhydrazine (Strohecker and Henning, 1967), and results were expressed as mg ascorbic acid 100g⁻¹.

Results were submitted to analysis of variance. When the significance was found, the averages were compared by the Tukey test, at 5% probability. The models were adjusted based on the significance of the parameters, in the coefficient determination. Statistical analysis was carried out using the software version R 3.2.3 (R Core Team, 2019).

Results and discussion

The values of firmness (F), titratable acidity (TA), soluble solids (SS), SS/TA ratio, vitamin C, lycopene and β-carotene were influenced ($P < 0.05$) by interaction of N x S rates. In relation to pH values, these were influenced ($P < 0.05$) by the isolated rate factors of N and S only.

For firmness, the interaction between the rates of N and S (Figure 1) it was found that rates 0, 60 and 120 mg dm⁻³ of S were adjusted

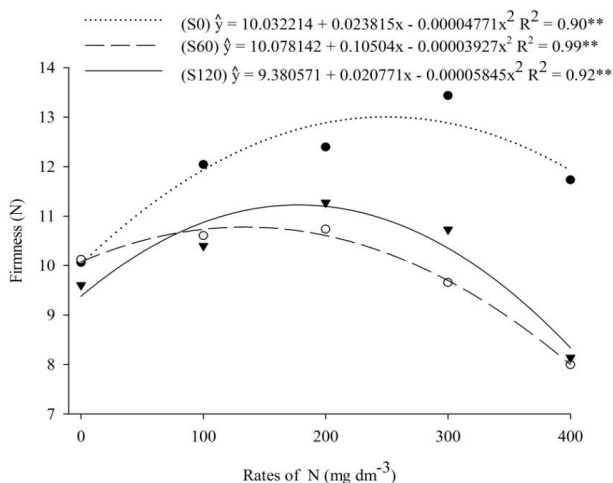


Figure 1. Firmness in the tomato fruits submitted to the rates of N and S. S0: Rates 0 mg dm⁻³; S60: Rates 60 mg dm⁻³; S120: Rate 120 mg dm⁻³. **: Significant at 1% by the F test.

to the quadratic regression with the maximum points estimated at 13; 10; and 11N, respectively. Possibly the N contributed to greater firmness in the fruits until the optimum level, and then decrease was verified.

According to Mello et al. (2020), values of firmness found in the study did not present differences. On the other hand, Moreno et al. (2014), while evaluating the increase of rates of N in low level of deficiency and high level of toxicity and how they affect in post-harvest quality in two tomato varieties, observed that above the ideal treatment rate (30 mM) there was a reduction of the firmness of the fruit in the order of 25 to 31.9% for both varieties, as a consequence of the high level of toxicity, corresponding to what was verified in this study.

Soluble solids confer fruit flavour as a function of sugar content, however, variations in this content are expected to depend on the genotype and several factors that influence the ability to import the assimilated photosynthetic by the fruit. Therefore, the uses of cultivars in which the existence of this characteristic can be guaranteed are of fundamental importance in order to allow greater acceptability by the consumer.

The soluble solids content showed an increasing linear adjustment for the 0 mg dm⁻³ rate of S, varying the Brix value from 3.5 to 4.2, and the 60 mg dm⁻³ S rate adjusted to the quadratic regression, with the minimum point of Brix estimated at 3.6 as a function of the rates of N (Figure 2). However, the rate of 120 mg dm⁻³ had no polynomial adjustment, but its overall mean of Brix was 3.9. The soluble solids are the main component responsible for the fruit flavour, being influenced by the fertilization, temperature, irrigation and the genetic trait of the cultivar, which may have contributed to reach this average. The values match with those observed

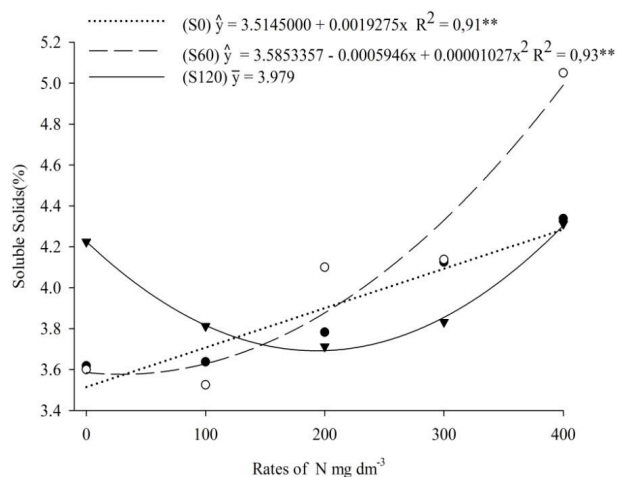


Figure 2. Soluble solids in the tomato fruits submitted to the rates of N and S. S0: Rates 0 mg dm⁻³; S60: Rates 60 mg dm⁻³; S120: Rate 120 mg dm⁻³. **: Significant at 1% by the F test.

by Monteiro et al. (2008) when evaluating the nutritional level in Italian tomatoes used in industrial processing, but are opposed to those observed by Marouelli et al. (2014) and Bérnard et al. (2009) who obtained a mean value of °Brix of 4.6 as a function of the reduction of N rates.

The titratable acidity in the tomato fruit presented a quadratic adjustment decreasing for rates 0 and 120 mg dm⁻³ of S, reaching a minimum of 0.26 and 0.25%, corresponding to rates 203 and 168 mg dm⁻³ of N (Figure 3A). Regarding the rate 60 mg dm⁻³ of S had a linear adjustment as a function of increasing rates of N, reaching a maximum value of TA in the range of 0.32% corresponding to the rate of 400 mg dm⁻³ of N. Values found in this study are considered low compared to the values reported by Tigist et al. (2013) and Mello et al. (2020). But, similar results to the present study were observed by Bérnard et al. (2009) and Kuscü et al. (2014) where they found a significant increase in the titratable acidity as a function of the applied N rates.

The pH value in the tomato pulp increased in a quadratic manner with due to the increase of the rates of N up to the estimated rate of 223 mg dm⁻³ of N, corresponding to the maximum value of 4.26 (Figure 3B), while the rates of S did not statistically differ, presenting a general average of 4. According to Monteiro et al. (2008) pH values below 4, a range considered acidic for tomatoes, is important, because it avoids the proliferation of microorganisms and reduces the period of sterilization of the raw material. For Porto et al. (2014), pH values obtained in the present study may be associated with the higher accumulation of mineral solutes in the pulp of tomato fruits, which caused the consumption of organic acids in the assimilation of N, due to the presence of NH₄⁺.

The pH and titratable acidity (TA) are two important quality attributes of processing tomatoes. Nevertheless, tomatoes typically have sufficient acidity to maintain a pH below 4.6 and, accordingly, are not classified as a low acid food. Because of this tomatoes do not require the more drastic thermal treatments required of foods classified as low acid for the destruction of spoilage microorganisms, to ensure food safety.

The SS/TA ratio in the tomato fruit pulp (Figure 4) shows that for the rates 0 and 120 mg dm⁻³ of S the data were adjusted to an increasing quadratic regression with the maximum point estimated at 246 and 157 mg dm⁻³, respectively, corresponding to a SS/TA ratio of 14.6 and 14.8 respectively. The rate of 60 mg dm⁻³ of S presented a SS/TA ratio of the order of 14.7. The values of the SS/TA ratio obtained in the present study are considered good, since they are above 10, according to what was stipulated by Kader et al. (1978). Schwarz et al. (2013) found values similar to those mentioned above, which allowed inferring that this relationship can be influenced by TA, since the reduction of these values, allowed the increase of this relation, as a function of the rates of N.

Vitamin C levels did not adjust to polynomial regression at rates of 0 and 120 mg dm⁻³ of S, thus presenting an overall mean of 42 and 37 mg 100g⁻¹ of ascorbic acid, respectively, as a function of increasing rates of N (Figure 5). In relation to the rate of 60 mg dm⁻³ of S in this treatment, quadratic behavior was obtained as a function of N rates, with a maximum increase of 48 mg 100g⁻¹ of ascorbic acid at the rate of 84 mg dm⁻³ of N, decreasing later. It may have been influenced by the N, since it interferes in the availability of its components, having a positive effect on

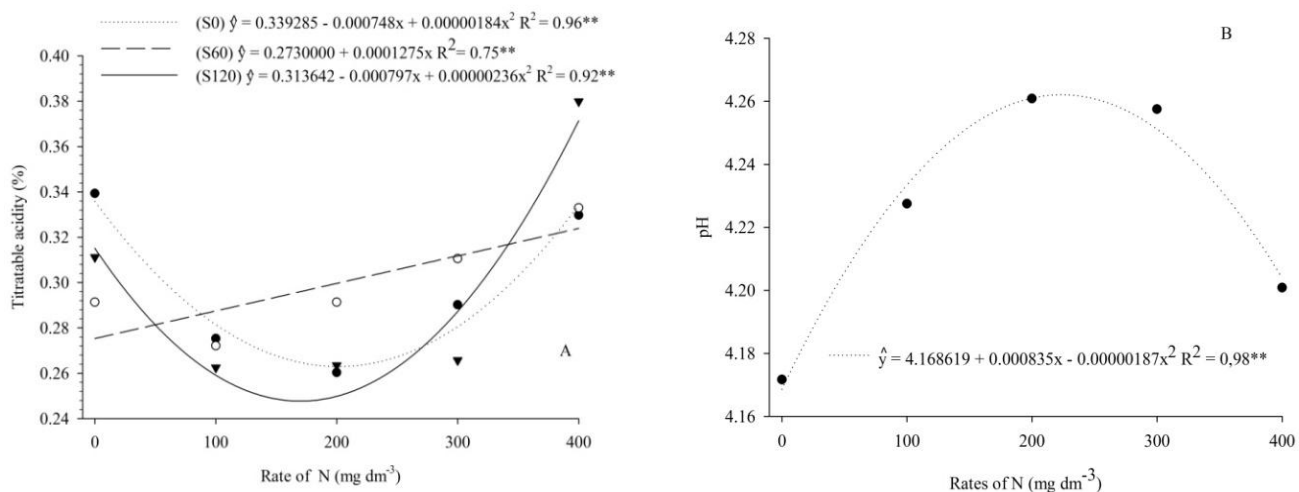


Figure 3. Titratable acidity (A) and pH (B) in the tomato fruits submitted to the rates of N and S. S0: Rates 0 mg dm⁻³; S60: Rates 60 mg dm⁻³; S120: Rate 120 mg dm⁻³. **: Significant at 1% by the F test

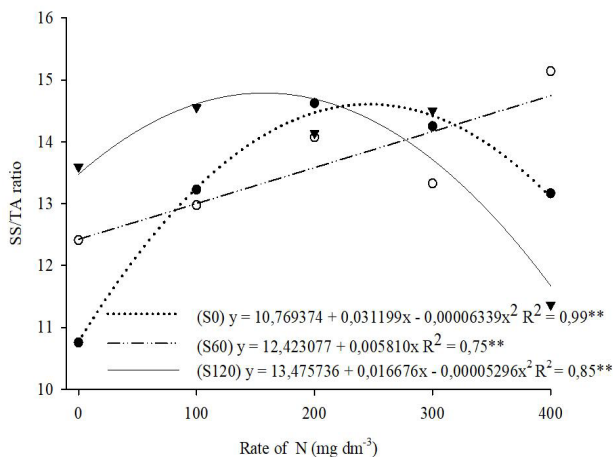


Figure 4. SS/TA in the tomato fruits submitted to the rates of N and S. S0: Rates 0 mg dm⁻³; S60: Rates 60 mg dm⁻³; S120: Rate 120 mg dm⁻³. **: Significant at 1% by the 'F' test.

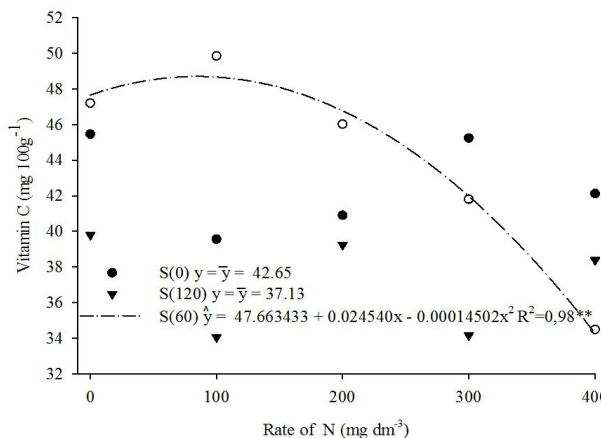


Figure 5. Vitamin C in the tomato fruits submitted to the rates of N and S. S0: Rates 0 mg dm⁻³; S60: Rates 60 mg dm⁻³; S120: Rate 120 mg dm⁻³. **: Significant at 1% by the 'F' test.

vitamin C and some phenolic compounds in low applications, besides interfering in the availability of minerals. These results are in agreement with Bérnard et al. (2009) who observed a decrease in the vitamin C content due to an increase in the supply of N. Souza et al. (2010) evaluating the application of wastewater from pigs after filtration in the tomato, obtained vitamin C content ranging from 15 and 22 mg 100g⁻¹. The vitamin C content found in this study was higher than the reported by Tigist et al. (2013).

Tomato fruits presented a concentration of lycopene at rates 0 and 60 mg dm⁻³ of S that had no polynomial adjustment, presenting the general average of 37 and 42 µg g⁻¹, respectively (Figure 6A). At the rate of 120 mg dm⁻³ of S was adjusted to the decreasing quadratic regression with the minimum point estimated at 32 µg g⁻¹, corresponding to the rate of 181 mg dm⁻³ of N. These results are in agreement with those verified by Kuscu et al. (2014) where observed a decrease in the concentration of lycopene as a function of the supply of N.

According Langi et al. (2018), lycopene predominates 60 - 74% of the carotenoids and is responsible for the red color. The concentration of lycopene in tomatoes is related to the better visual perception of the products, due to the attribute of quality that directly affects their commercial acceptance, besides possessing antioxidant properties.

The interaction of N and S rates showed a concentration of β-carotene at rates 0 and 60 mg dm⁻³ of S, which had no polynomial adjustment, with a mean of 32 and 41 µg g⁻¹, respectively (Figure 6B). On the other hand, the rate of 120 mg dm⁻³ of S was adjusted to the decreasing quadratic regression with the minimum point estimated at 32 µg g⁻¹, corresponding to the rate of 181 mg dm⁻³ of N. It was observed both lycopene concentrations for the β-carotene concentration, the rates of 0 and 60 mg dm⁻³ did not influence the analysed variables, in contrast with a rate of 120 mg dm⁻³, which, due to the increasing rates of N, presented a reduction of 79% in the beta-carotene concentration.

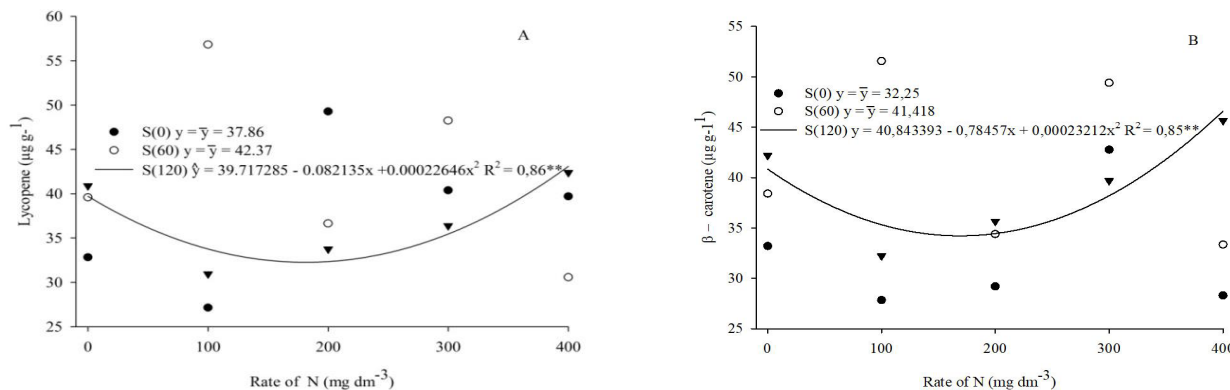


Figure 6. Lycopene (A) and β-carotene (B) in the tomato fruits submitted to the rates of N and S. S0: Rates 0 mg dm⁻³; S60: Rates 60 mg dm⁻³; S120: Rate 120 mg dm⁻³. **: Significant at 1% by the 'F' test.

Conclusion

The interaction between N and S rates influenced fruit firmness, soluble solids, titratable acidity and SS/TA ratio positively, but negatively for vitamin C, lycopene and β -carotene, although it did not alter fruit quality characteristics of the tomato in relation to the recommended values. The pH was only influenced by increasing rates of N, reaching a maximum of 4.2 that resulted in fruits with a recommended acidity level.

Nevertheless, should be considered in future researches with N and S as a factor to understand new experiences in tomatoes grow and post-harvest, as a fact that this research was only conducted in greenhouse.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for funding the research project and granting scholarships.

References

- Bastos, A.R.R.; Alvarenga, M.A.R.; Carvalho, J.G.; Pinho, P.J. 2013. *Nutrição mineral e adubação*. In: Alvarenga, M.A.R. *Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidropônica*. Lavras: Ed. UFLA. 65 p.
- Bénard, C.; Gautier, H.; Bourgaud, F.; Grasselly, D.; Navez, B.; Caris-veyrat, C.; Weiss, M.; Génard, M. 2009. Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 57(10), 4112–4123. <https://doi.org/10.1021/jf8036374>
- FAO. *Faostat 2019: Production crops* <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- IAL. Instituto Adolfo Lutz. 2005. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Brasil*. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. <http://www.ial.sp.gov.br/>
- Kader, A.A.; Morris, L.L.; Chem, P. 1978. Evaluation of two objective methods and a subjective rating scale for measuring tomato fruit firmness. *J Am Soc Hortic Sci.*, 103 (1), 70-73. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19780306551>
- Kuscu, H.; Turhan, A.; Ozmen, N.; Aydinol, P.; Demir, A.O. 2014. Optimizing levels of water and nitrogen applied through drip irrigation for yield, quality, and water productivity of 28 processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Hortic Environ Biotechnol*, 55, 103-114. <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0180-9>
- Malavolta, E. 1981. *Manual de química agrícola: adubos e adubação*. Agronômica Ceres. Sao Paulo. 596 p. <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/biblioteca=vazio&busca=autoria:%22MALAVOLTA%20E.%22&qFacets=autoria:%22MALAVOLTA%20E.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=3>
- Marouelli, W.A.; Souza, R.B.; Braga, M.B.; Silva, W.L.C. 2014. Evaluation of sources, rates and application schedules of nitrogen on drip-irrigated tomato. *Hortic Bras*, 32(3), 327-335. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000300015>
- Marschner, P. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. London: Elsevier Ltd. 672 p. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- Mello, S.C.; Pavuluri K.; Pierce, F.J. 2020: Polyhalite as a sulfur source for fresh market tomato production in Brazil. *Journal of Plant Nutrition*, 43(1), 92-107. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659325>
- Monteiro, C.S.; Balbi, M.E.; Miguel, O.G.; Pentead, P.T.P.S.; Haracemiv, A.M.C. 2008. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate "tipo italiano". *Alimentos e Nutrição*, 19(1), 25-31. <http://serv-bib.fcfa.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/196/201..>
- Moreno, N.F.; Albelardo, N.B.; Ramona, P.L; Ana, C.G.F.; Adriana, H.R.; Loreto, R.H. 2014. Effect of nitrogen deficiency and toxicity in two varieties of tomatoes (*Lycopersicum esculentum* L.). *Agric Sci*, 5, 1361-1368. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2014.514146>
- Langi, P.; Kiokias, S.; Varzakas, T.; Proestos, C. 2018 *Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries*. In: Barreiro C., Barredo JL. (eds) *Microbial Carotenoids. Methods in Molecular Biology*, vol 1852. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3
- Porto, J.S.; Amorim, T.N.H.; Rebouças, T.N.H.; Lemos, O.L.; Luz, J.M.Q.; Costa, R.Q. 2014. Índice SPAD e crescimento do tomateiro em função de diferentes fontes e rates de nitrogênio. *Scientia Plena*, 10 (11), 1-8. <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/2041>
- R development Core Team. 2019. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, R Foundation for Statistical Computing. www.r-project.org
- Rodriguez-Amaya, D. 2001. *A Guide to Carotenoids Analysis in Food*. International Life Sciences Institute Press, Washington, 64 p.
- Schwarz, K.; Resende, J.T.V.; Preczenhak, A.P.; Paula, J.T.; Faria, M.V.; Dias, D.M. 2013. Desempenho agrônomico e qualidade físico-química de híbridos de tomateiro em cultivo rasteiro. *Hortic Bras*, 31(3), 410-418. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000300011>
- Silva, M.L.S.; Trevizam, A.R.; Piccolo, M.C.; Furlan, G. 2014. Tomato production in function of sulfur rates application. *Applied Research & Agrotechnology*. 7(1), 47-54. <http://dx.doi.org/10.5935/PAeT.V7.N1.05>
- Soil Survey Staff, 2014. *Keys to soil taxonomy*. Soil Conserv. Serv. 12 Ed., 372 p. https://www.nrcs.usda.gov/wps/PA_NRCSCConsumption/download?cid=stelprdb1252094&ext=pdf
- Strohecker, R.L.; Henning, H.M. *Análises de vitaminas: métodos comprovados*. Editorial Paz Montalvo Madrid, España. 428.
- Zelená, E.; Holasová, M.; Zelený, F.; Fiedlerová, V.; Novotná, P.; Landfel, A.; Houška, M. 2009. Effect of sulphur fertilization on lycopene content and colour of tomato fruits. *Czech J Food Sci*. 27, 80-84. <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/07590.pdf>

Water requirements and restrictions to sugarcane in cane plants and ratoon cane cycles in Southern Brazil

Requerimientos y restricciones de agua en caña de azúcar plantilla y soca en el sur de Brasil

Bruno César Gurski ¹, Jorge Luiz Moretti de Souza ², Emerson Gerstemberger ³, Ricardo Augusto de Oliveira ⁴

¹Federal University of Paraná. Department of Soil and Agronomic Engineering. Curitiba, Paraná, Brazil. ✉ brunocep@gmail.com

²Federal University of Paraná. Department of Soil and Agronomic Engineering. Curitiba, Paraná, Brazil. ✉ jmoretti@ufpr.br

³Federal University of Paraná. Department of Soil and Agronomic Engineering. Curitiba, Paraná, Brazil. ✉ egerstemberger@gmail.com

⁴Federal University of Paraná. Department of Phytotechnics and Plant Health. Curitiba, Paraná, Brazil. ✉ rico@ufpr.br

Rec.: 22-09-2016 Acep.: 22-05-2020

Abstract

In a site with a Cfa-type climate in southern Brazil, the water requirements and restrictions for the cultivation of sugar cane (*Saccharum* spp.), in plant and soca (second cut) were characterized. Water availability was calculated based on the daily water balance and evapotranspiration was estimated using the Penman-Monteith method. The thermal and water requirements of sugarcane were calculated taking as reference the agroecological zoning in the state of Paraná, Brazil. Water requirement index did not show limiting factors for the development of the crop both in plant and soca. Water deficit was the most important agroclimatic risk factor. In Paranavaí-PR, Brazil, sugarcane is a safe crop, with possibilities of saving water in the development stage (phase II), with frequent additional irrigation needs of 508.8 mm/crop cycle for plant and 486.5 mm/sugarcane cycle for soca.

Keywords: Climate; *Saccharum* spp.; Southern Brazil; Water balance, Water deficit, WRSI.

Resumen

En un sitio con clima tipo Cfa del sur de Brasil, se caracterizaron los requerimientos y restricciones de agua para el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en plantilla y soca (segundo corte). La disponibilidad de agua fue calculada con base en el balance hídrico diario y la evapotranspiración se estimó mediante el método de Penman-Monteith. Los requerimientos térmicos e hídricos de la caña fueron calculados tomando como referencia la zonificación agroecológica en el estado de Paraná, Brasil. El índice de requerimiento de agua no mostró factores restrictivos para el desarrollo del cultivo tanto en plantilla como en soca. El déficit de agua fue el factor de riesgo agroclimático más importante. En Paranavaí-PR, Brasil, la caña de azúcar es un cultivo seguro, con posibilidades de ahorro de agua en la etapa de desarrollo (fase II), con necesidades de riego adicional frecuente de 508.8 mm por ciclo de cultivo en plantilla y 486.5 mm por ciclo de caña soca.

Palabras clave: Balance hídrico; Déficit de agua; Requerimiento hídricos; *Saccharum* sp., Sur de Brasil.

Introduction

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the main products of Brazilian agribusiness and the area planted in Paranavaí is booming. In the Paraná State, Brazil, sugarcane occupies an area of 607 thousand hectares, with an annual production of 50 million t and Paranavaí region accounts for 20% of this production (SEAB 2015).

Sugarcane is a semi-perennial crop widely cultivated, subjected to different environmental and management conditions, causing differences over the cycle (Silva et al., 2008); growth and yield are influenced by many environmental factors, but temperature and precipitation are known to be the most influential factors on crop development (Vianna and Sentelhas, 2014).

Water is considered a limiting factor for sugarcane since the potential production is possible with adequate water availability (Inman-Bamber and Smith, 2005). Water stress affects the rate of water absorption, biomass accumulation, structural plant growth and changes the assimilation and sucrose accumulation (Singels et al., 2010). Damage produced by water stress depends on the stress duration, the crop and its development stage. The longer the low water availability period, greater the damage on productivity of stalks and sucrose (Inman-Bamber, 2004).

Systematization of climate data, considering the development stages of crops, contributes to improve resource planning, productivity and environmental sustainability. However, the effect of water stress on sugarcane at different stages of its development is not well defined in literature, affecting estimates of crop behaviour when soil moisture is above or below optimum values (Silva et al., 2013).

The behaviour of production facing climate change in sugarcane management must promote and impellent efficient use of rainwater and minimize restrictive periods for crop development. Detailed knowledge of water dynamics in soil during crop development provides essential elements to establish or improve agricultural management practices aimed to optimize productivity. Water balance enables to assess with detail, water conditions for crop development, allowing the verification of all incomes and outcomes of soil water, according to the peculiarities of the specie, resulting in soil water balance in the period (Brito et al., 2009).

From information obtained in water balance, the agroclimatic characterization provides a concise inventory of agroclimatic potential and restrictions for plant development, assisting in the formulation of policies and adequacy of crop

to circumvent existing limitations and establish short and term development strategies (Silva et al. 2013).

The present study aimed to characterize sugarcane water relations (requirements and restrictions) for climate type Cfa, in Southern Brazil, and identify periods in which water restriction does not produce significant effects on crop yield.

Material and methods

The experiment was conducted in Paranavaí, State of Paraná, Brazil, coordinates 22°58'44"S, 52°27'51"W, and altitude of 480 m. The region has Cfa climate type, subtropical, with average annual rainfall of 1350 mm. The soil was classified as Oxisol, medium texture, with soil bulk density ranging from 1.5 to 1.7 Mg m⁻³ (Alvares et al., 2014).

Agrometeorological data sets available in Paranavaí region (12 years from 1997 to 2009), collected in automatic weather station were analysed. The daily *ET_o* was estimated by Penman-Monteith method (Allen et al., 1998). The study includes both cane-plant and ratoon cane, between 1997 and 2009: crop coefficients (*K_c*) were recommended by Allen et al. (1998), whose periods were fitted to the developmental stages proposed by Machado et al. (2009), and the rooting system effective depth (*z*) was recommended by Buso et al. (2009) (Table 1).

The agroclimatic and suitability characterization was based on the methodology proposed by EMBRAPA (2009), which indicates levels of climate risk classification (Table 2). Using sugarcane phenology data, soil profile water retention and climatological elements that were inserted into a local daily water balance, enabling to monitor restriction factors for the crop in all growing seasons. The frost risk in place was based on the data and considerations made by Wrege et al. (2005), considered not restrictive to sugarcane development (Risk = 0.26%).

Water Requirements Satisfaction Index (WRSI) corresponds to a dimensionless value ranging from zero (0) to one (1), with values close to one indicate ideal water supply. Their definition is originated by the ratio between actual evapotranspiration (*ET_a*) and crop evapotranspiration (*ET_c*) (Vianna and Sentelhas, 2014).

The estimated water components, for both cane-plant and ratoon, were obtained in a climatological water balance (CWB) based on an adaptation of the methodology proposed by Thornthwaite and Mather (1955), because there is no calibration for sugarcane to the climate type in order to use more modern models as

Table 1. Sugarcane rooting system effective depth (z), development phases duration and their crop coefficient (Kc).

Development phases*	Stage start	Stage end	Duration (days)	Kc (dimensionless)	z (m)
----- Sugarcane plant -----					
I	April	November	231	0.40	0.60
II	November	April	145	1.25	0.60
III	April	July	108	0.75	0.80
----- Ratoon sugarcane -----					
I	July	October	93	0.40	0.60
II	October	March	160	1.25	0.80
III	March	July	112	0.75	0.80

* I – sprouting to intense tillering; II – growth in stature; III – reduction, growth and sucrose accumulation.

Table 2. Risk classification parameters for sugarcane in Brazil.

Classification	Risk	Consideration	Average Temp.	WRSI*	Frost risk	Water deficit
A - Indicated	Low	There is no one.	> 19 °C	> 0.6	< 20%	< 200 mm
B - Indicated	Low	Saving irrigation	> 19 °C	> 0.6	< 20%	200 - 400 mm
C - Not indicated	High	Frost risk / thermal shortage	< 19 °C	> 0.6	> 20%	200 - 400 mm
D - Not indicated	High	Intensive irrigation	> 19 °C	< 0.6	< 20%	> 400 mm
E - Not indicated	High	Excess water	—	—	—	—

Source: adapted from EMBRAPA (2009). * WRSI – Water Requirements Satisfaction Index.

Aquacrop. The analysis consisted of a daily sequential CWB, based on daily precipitation (P); daily reference evapotranspiration (ET_0); sugarcane crop coefficient (K_c) in development stages; total water capacity (TAW); and soil water depletion fraction (p) for sugarcane. The output components are daily values of soil water storage (S), actual evapotranspiration (ET_a), water deficit (Def) and surplus (Sur).

The soil physical parameters were derived from preliminary experiment carried out in the same area and period, being the determinations held with EMBRAPA (1997) methods, and soil water retention parameters obtained from Van Genuchten (1980) equation.

The total water capacity (TAW) and readily available water (RAW) were determined in a previous study based on soil water depletion fraction ($P = 0.65$) for sugarcane (Allen et al., 1998). The TAW values found were 65.3 and 93.9 mm for the depths of 0.60 and 0.80 m, respectively. To monitor of soil water storage was used the equation proposed by Rijtema and Aboukhaled (1975). The ET_c values were calculated using the equation $ET_c = ET_0 * K_c$ where ET_c is the maximum crop evapotranspiration (mm/day), ET_0 is the reference evapotranspiration (mm/day), and K_c represents crop coefficient (dimensionless).

The obtaining statistical parameters of Probability Density Function (PDF) of best fit and consequently the probability of the CWB components (ET_0 , P , S , ET_a , Def and Sur) were

determined with the following steps: grouping the daily values of CWB components in ten-day periods; setting the frequency distribution with the observed data series; calculating statistical parameters based on five PDF's (range, normal, exponential, triangular and uniform) with the series of ten-day periods values; adherence verification of the ten-day periods values at five PDF's with Kolmogorov-Smirnov test at 5% probability; PDF choice that which best fit to the observed in ten-day periods values; probable values determination (Souza et al., 2013).

Results and discussion

The region presented in the study period (1997-2009) air annual average temperature of 22.9 °C, ranging from 19.0 °C in the coldest month (July) and 25.5 °C in the hottest month (February). The lowest daily value of temperature checked on site, for the analysed period, was 0.2 °C (07/13/2000) and the highest was 38.8 °C (10/29/2007). Annual average precipitation (P) was 1422.1 mm/year, with monthly precipitation ranging from zero (August/99, August/07 and September/07) and 469.8 mm/month (October/09) (Figure 1).

In the studied period (1997-2009) mean P of 1657.5 mm per cycle and 1333.1 mm/cycle to sugarcane plant and ratoon sugarcane, respectively. Based on considerations of Dantas Neto et al. (2006), it was found that the occurrence of rainfall throughout the years studied was close to the values indicated to the

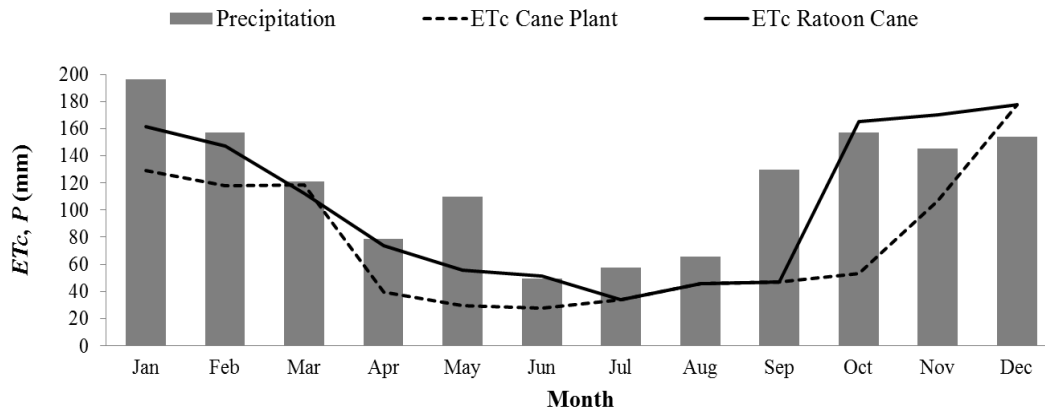


Figure 1. Monthly average values of sugarcane evapotranspiration (ET_c) and precipitation (P), for Paranavaí, in the period 1997-2009.

cultivation of sugarcane, with good distribution of rainfall volumes during vegetative growth. It was found that periods with water demand (ET_c) were greater than P , but in general, trending variables over the studied years were monitored (Figure 1).

Knowledge of total values of the components of CWB, mostly from water stress (Def) occurred in the whole cycle of the crop, is essential to understand the constraint parameters for the sugarcane development. The sugarcane with planting in April suffered water stress in the development phase, in partly of the maturation phase, comprising a period from December to May (six months). The ratoon cane, whose regrowth occurred in July, suffered water stress in development phase and part of maturation phase from October to April (six months) (Table 3).

For cane plant, only 33.3% of the seasons analysed had cumulative Def along the seasons, below 200 mm/season (Table 3). Values obtained are considered limiting for the cultivation of sugarcane, which, according to EMBRAPA (2009), get climate risk rating of "A-Indicated". For climate risk rating "B-Indicated", which covers Def range between 200 and 400 mm per season, 41.7% of analysed seasons fit this range, with the caveat to rescue irrigation. For ratoon cane (Table 3) the cumulative Def along the seasons presented the same percentage within the climate risk classes recommended by EMBRAPA (2009) for sugarcane, getting between 112.7 and 595.4 mm/season. Vianna and Sentelhas (2014) identified climate risk moderate to very low, for the same type of soil in Maringá, Brazil, corroborating information obtained for Paranavaí, with high or very high risk for every month of the year.

The lowest yields (2004/05, 2007/08 and 2008/09) were 15.4% lower than the average yield in this region (80 t/ha) for ratoon cane. It was possible to verify that not necessarily a

higher value of water surplus will reflect in a greater yield, but the results demonstrate a direct relationship between yield and water components (Silva et al., 2013). In this sense, the lowest yields occurred in the seasons with the lowest precipitation, ET_a and, consequently, the highest water deficits (Table 3). In these seasons, the precipitation was always lower than the crop evapotranspiration (ET_c).

It is also important to note that to obtain a ratoon cane yield higher than the average for the region, the minimum ET_a must be higher than 913.7 mm/season, as occurred in 1999/00 (Table 3).

Def values (Table 3) cannot represent the effect of water stress at different development phases, because the degree of injury promoted by stress depends considerably on the plant development phase (Silva et al., 2013). For instance, Inman-Bamber and Smith (2005) say that sugarcane has resilience to moderate water stress during phase I. Values of the sequential CWB components for sugarcane and ratoon cycles, in development phases I, II and III, are presented in Table 4.

All development phases presented deficiency, according to Machado et al. (2009) and Silva et al. (2013), the water deficit causes a significant reduction in production in the three development phases of sugarcane, but the development phase II had higher Def values compared to others, greater than 13.1 mm/ten-days, for both the sugarcane and ratoon. The identification of this water stress is essential for the management and the consequent crop yield, because this phase is the period of greatest development and increased water demand of the plant.

Greater frequency distribution details of the ten-days CWB components to sugarcane plant and ratoon, at 1997/98 to 2008/09 seasons, in Paranavaí can be checked in Table 5.

Table 3. Yield and components of the water balance performed for the 1997/1998 to 2008/2009 seasons of sugarcane and ratoon cane in Paranavaí, Southern Brazil.

Season	<i>ETo</i>	<i>ETc</i>	<i>ETa</i>	<i>P</i>	<i>Def</i>	<i>Sur</i>	<i>ETa/ETc</i>	Yield** (t/ha)
	(mm/season)							
----- Sugarcane -----								
1997/98	1593.5	1218.3	1074.6	1829.6	143.7	805.9	0.88	***
1998/99	1529.7	1214.3	1049.1	1879.6	165.2	862.4	0.86	***
1999/00	1752.6	1341.7	1003.5	1626.2	338.2	592.4	0.75	***
2000/01	1618.0	1234.5	1160.3	1875.6	74.3	708.1	0.94	***
2001/02	1685.3	1306.0	1042.2	1819.4	263.8	792.8	0.80	***
2002/03	1700.3	1279.5	1127.2	1948.4	152.4	811.8	0.88	***
2003/04	1642.9	1269.6	1024.6	1805.4	245.1	743.0	0.81	***
2004/05	1631.6	1293.5	854.8	1907.6	438.7	1045.1	0.66	***
2005/06	1660.6	1283.7	940.9	1636.8	342.8	702.9	0.73	***
2006/07	1714.1	1304.2	1093.2	1589.0	211.0	474.6	0.84	***
2007/08	1728.1	1312.6	875.6	1127.8	437.0	269.9	0.67	***
2008/09	1654.4	1292.7	596.7	1016.0	696.1	451.7	0.46	***
Mean	1659.3	1279.2	986.9	1671.8	292.3	688.4	0.77	***
s*	62.3	39.0	154.2	304.1	171.9	210.5	0.13	***
CV*	3.8	3.1	15.6	18.2	58.8	30.6	16.93	***
----- Ratoon cane -----								
1997/98	1279.5	1180.0	1067.3	1625.0	112.7	551.6	0.90	130.60
1998/99	1235.3	1174.0	1020.6	1492.6	153.5	443.0	0.87	130.16
1999/00	1442.5	1320.0	913.7	1251.6	406.3	341.1	0.69	98.99
2000/01	1268.0	1198.6	1068.3	1659.0	130.4	586.9	0.89	140.83
2001/02	1387.6	1270.6	1043.2	1439.0	227.5	464.2	0.82	127.94
2002/03	1330.9	1233.7	1056.5	1479.2	177.2	408.6	0.86	115.79
2003/04	1327.8	1250.5	962.0	1508.8	288.4	500.3	0.77	141.60
2004/05	1359.4	1249.0	879.8	1284.6	369.3	426.1	0.70	66.00
2005/06	1294.6	1203.9	951.0	1373.8	252.9	433.1	0.79	154.19
2006/07	1382.0	1263.9	1026.6	1359.8	237.3	369.3	0.81	***
2007/08	1363.4	1252.6	791.9	1003.6	460.7	147.6	0.63	67.92
2008/09	1367.4	1256.9	661.5	812.6	595.4	221.9	0.53	69.12
Mean	1336.5	1237.8	953.5	1357.5	284.3	407.8	0.77	113.01
SD	58.9	42.1	125.5	245.7	147.2	126.1	0.11	32.38
CV	4.4	3.4	13.2	18.1	51.8	30.9	14.74	28.65

* SD – standard deviation; CV – coefficient of variation. ** The harvest of the ratoon cane (second cut) occurred in two-year-old plants.

*** There was no harvest in the season.

Analysing the statistical parameters of ten-days components for CWB, considering the development phases of sugarcane and ratoon (seasons 1997/98 to 2008/09), it was verified for cycles cane plant and ratoon that *ETo*, *P*, *Def* and *Sur* components set up the Gamma distribution, being 75% the probability to occur $Def \leq$ mm/ten-days. The *ETc*, *S* and *ETa* components showed no adjustment to any of tested distributions. The highest *ETa* decennial values occurred during the development phase II, differing in only 7.7% between cane plant and ratoon. The mean values found for this phase were 35.9 mm/ten-days and 38.9 mm/ten-days, respectively.

Simple registry of potential water deficit does not necessarily imply penalizing productivity, being convenient to analyze the Water Requirements Satisfaction Index (WRSI) that seeks to divide in classes the water risk levels. According to EMBRAPA (2009), values above 0.6 indicate that

the plant is supplied with water, having no effects on production. It was verified that the culture systems (plant and ratoon), behaved in a similar way as to supply the water needs of sugarcane in Paranavaí (Figure 2).

For cane plant (Figure 2a) every period corresponding to the development phase I (budding to heavy tillering) had WRSI values above 0.6, indicating adequate water supply. For the development phase II (growth in stature) 25% of the analysed periods (2004/05, 2007/08 and 2008/09) had values below the recommended range, indicating possible reduction of plant growth due to water deficit. In development phase III (reduced growth and sucrose accumulation) 25% of the analysed periods also had lower values than recommended. However, Inman-Bamber and Smith (2005) consider that a desirable restriction at phase III forces the physiological rest and sucrose enrichment.

Table 4. Average water balance components, in various development phases of sugarcane and ratoon, held for the 1997/1998 to 2008/2009 seasons in Paranavaí, Southern Brazil.

Development phases	<i>ET_o</i>	<i>ET_c</i>	<i>P</i>	<i>"P - ET_c"</i>	<i>ET_a</i>	<i>Def</i>	<i>Sur</i>
	----- (mm/phase) -----						
Sugarcane							
I	771.5	308.6	735.4	426.7	292.0	16.6	428.0
II	611.7	764.7	643.8	-120.9	528.1	236.5	158.0
III	282.0	211.5	278.3	66.8	158.8	52.7	91.7
Ratoon sugarcane							
I	318.7	127.5	270.6	143.1	112.3	15.2	146.7
II	697.2	871.2	753.7	-117.5	627.9	243.3	144.4
III	325.8	244.4	308.8	64.4	203.0	41.4	103.7

Table 5 - Frequency distribution of decennials Water Requirements Satisfaction Index (WRSI) to sugarcane and ratoon cane in seasons 1997/98 to 2008/09, in Paranavaí, Brasil.

Sugarcane plant			Ratoon cane		
Classes	Frequency	Probability (%)	Classes	Frequency	Probability (%)
0.0 - 0.1	24	4.08	0.01 - 0.11	21	4.73
0.1 - 0.2	13	2.21	0.11 - 0.21	11	2.48
0.2 - 0.3	10	1.70	0.21 - 0.31	11	2.48
0.3 - 0.4	17	2.89	0.31 - 0.41	18	4.05
0.4 - 0.5	17	2.89	0.41 - 0.51	11	2.48
0.5 - 0.6	14	2.38	0.51 - 0.60	11	2.48
0.6 - 0.7	23	3.91	0.60 - 0.70	20	4.50
0.7 - 0.8	21	3.57	0.70 - 0.80	24	5.41
0.8 - 0.9	27	4.59	0.80 - 0.90	28	6.31
0.9 - 1.0	422	71.77	0.90 - 1.00	289	65.09

For ratoon cane (Figure 2b) 91.7% of the corresponding periods to the development phase I (budding to intense tillering) had WRSI values greater than 0.6, indicating adequate water supply. For the development phase II (growth in stature) 16.7% of the analysed periods (seasons 2007/08 and 2008/09) had lower values than recommended. According to Dantas Neto et al. (2006) and Oliveira et al. (2011), bad distribution and reduction of rainfall during the growth of sugarcane cause production drop and shortens the useful crop life, forcing the early renewal of sugarcane. In development phase III (reduced growth and sucrose accumulation) only 8.3 % of the analysed periods (2008/09) had lower values than recommended.

Interestingly, shorter intervals (ten-days) may have WRSI values well restrictive to crop development. Therefore, the need for ten-days WRSI frequency distribution analysis (Table 5).

Ratoon cane cycle, in development phase I, presented 89.2% higher WRSIs to 0.62, lower value than the submitted by sugarcane plant ($\approx 96\%$ WRSIs > 0.62). Probably, the result is due to the planting period and duration of the development phase (Table 2), which is distinct for the cane plant cycles (duration 231 days, from April to November) and ratoon cane (duration 93 days, June-October). The ratoon cane has limited its initial development to the winter season and early spring.

For development phase II, it was found that the cane plant cycle ($\approx 66.7\%$ WRSIs > 0.62) had increased restrictions to development that ratoon cane ($\approx 72.4\%$ WRSIs > 0.62), indicating that the occurrence period of the development phase II (145 days, from November to April) of cane plant provided less water supply that recorded for ratoon cane (160 days from October to March) (Table 1).

The occurrence period of the development phase III is similar to the cane plant and ratoon cane cycles (Table 1). As a result of the similarity of duration and time of occurrence of periods, satisfactory WRSIs (WRSI > 0.62) differed by 5.2% (cane plant $\approx 79.6\%$ and ratoon cane $\approx 84.8\%$).

Agroclimatic characterization in Paranavaí, for the analysed period (1997-2009), concluded that the cumulative *Def* throughout the seasons of cane plant ranged from 74.3 to 696.1 (mm/season), in seasons 2000/01 and 2008/09, respectively, with an average of 305.9 mm/season. For ratoon cane, *Def* ranged between 112.7 and 595.4 mm/season (season 1997/98 and 2008/2009), with an average of 299.9 mm/season, with a risk of frost lower than 20% and annual average temperature of 22.9°C. The average WRSI was 0.80 to cane plant and 0.76 for ratoon cane. Based on this information, and the methodology proposed by EMBRAPA (2009) it was found that Paranavaí has a low agroclimatic risk for sugarcane cultivation, with classification of

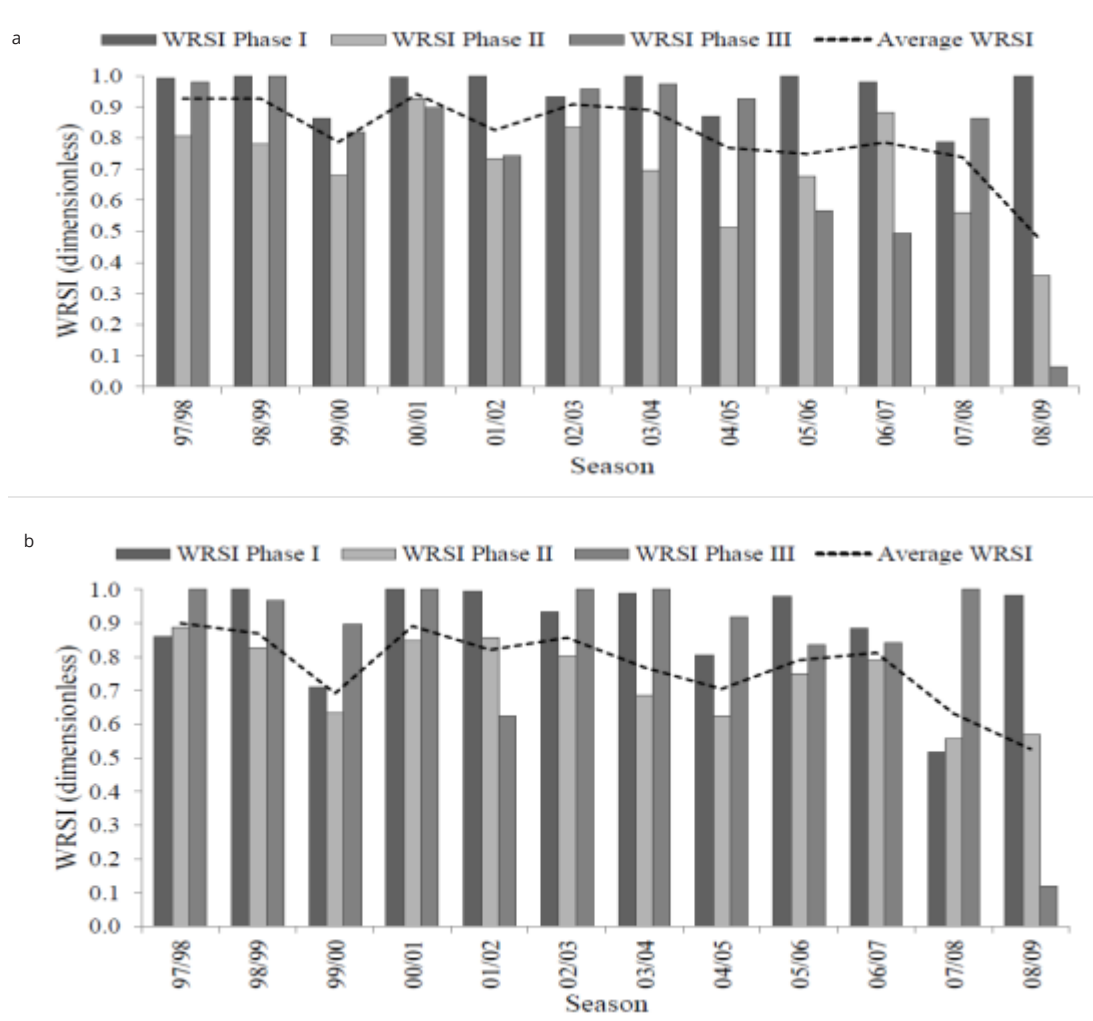


Figure 2. Water Requirements Satisfaction Index (WRSI), considering the development phases of sugarcane plant (a) and ratoon cane (b), seasons 97/98 to 2008/09, in Paranavaí, Southern Brazil.

Indicated (B), with the caveat to saving irrigation in the development phase II (growth in stature), to cane plant and ratoon cane.

For the studied seasons (1997/98 to 2008/09) it was observed that all seasons in period demanded supplemental irrigation, in at least

one development phase (Table 6). The cane plant demanded higher values of supplemental irrigation in relation to ratoon cane, which can be explained by the architecture of the root system, in cane plant its mainly explores the topsoil compared to ratoon cane, which presents an

Table 6. Estimated irrigation sheet on water balance, considering the development phases of cane plant and ratoon cane in 1997/98 to 2008/09 seasons, in Paranavaí, Southern Brazil.

Phase	Season											
	97-98	98-99	99-00	00-01	01-02	02-03	03-04	04-05	05-06	06-07	07-08	08-09
----- Cane plant (mm season ⁻¹) -----												
I	43.1	0.0	88.3	0.0	43.7	88.1	0.0	87.6	43.3	85.9	174.4	44.0
II	267.4	313.4	403.8	218.7	409.7	314.9	372.0	462.0	317.5	232.3	498.9	597.4
III	61.2	0.0	62.7	0.0	123.8	0.0	0.0	69.2	184.7	185.5	126.0	185.9
Total	371.6	313.4	554.8	218.7	577.2	403.0	372.0	618.9	545.6	503.8	799.3	827.3
----- Ratoon cane (mm season ⁻¹) -----												
I	42.8	0.0	88.4	0.0	43.6	0.0	0.0	44.3	43.3	42.6	86.2	87.4
II	191.5	316.1	449.4	258.2	320.9	316.9	519.1	445.5	328.0	321.0	445.4	514.3
III	0.0	0.0	124.5	0.0	189.3	0.0	0.0	61.6	187.3	123.8	0.0	247.2
Total	234.2	316.1	662.2	258.2	553.8	316.9	519.1	551.3	558.6	487.3	531.6	848.9

increase in operating deeper layers. The smallest root distribution in depth directly affects the TAW values, reducing water range available to the plant and providing greater number of irrigations for maintaining proper water storage to the plant (Silva et al., 2013).

The development phase II, both in cane plant as ratoon cane, were the periods had greater need for supplemental irrigation. At this phase the crop has its largest development, requiring more water to conduct gas exchange with the atmosphere (Inman-Bamber and Smith, 2005). Cane plant and ratoon cane cycles showed similar mean values of supplemental irrigation in the development phase II, with 367.3 and 368.8 mm/phase, respectively. The total water sheet varied between 218.7 and 848.9 mm/season, with an average 508.8 mm/season for cane plant and 486.5 mm/season for ratoon cane.

Conclusions

The average level of Water Requirements Needs Index does not demonstrate restrictive factors to the development of sugarcane in cycles cane plant and ratoon cane. Water deficit is the most important factor in agroclimatic risk classification for the cultivation of sugarcane for cycles cane plant and ratoon cane. Paranavaí is able to sugarcane cultivation, but it is possible to save irrigation water during the crop development stage (phase II). Sugarcane in Paranavaí needs supplemental irrigation of 508.8 mm/season to cane plant and 486.5 mm/season to ratoon cane with higher frequency of irrigation in the development phase II.

References

- Allen, R. G.; Pereira, L. S.; Raes, D.; Smith, M. 1998. *Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements*. Rome: FAO. <http://www.fao.org/3/x0490e/x0490e00.htm>
- Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.J.; Gonçalves, J.L.M.; Sparovek, G. 2014. Koppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*. 22 (6), 711-728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Brito, A. D.; Libardi, P. L.; Ghiberto, P. J. 2009. Water balance components in soils cropped to sugarcane, with and without nitrogen fertilization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 33(2), 295-303. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832009000200007>
- Buso, P. H.; Koehler, H. S.; Zambon, J. L.; Ido, O. T.; Bespalhok-Filho, J. C.; Weber, H.; Oliveira, R. A.; Zeni Neto, H. 2009. Sugarcane root system of RB855536 variety planted in one bud and three buds setts. *Scientia Agraria*. 10(5), 343-349. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v10i5.15185>
- Dantas Neto, J.; Figueredo, J. L.; Farias, C. H.; Azevedo, H. M.; Azevedo, C. A. 2006. Response of sugarcane, second leaf, to irrigation levels and topdressing manuring. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 10(2), 283-288. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662006000200006>
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 1997. *Manual de métodos de análise de solo*. 2. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Rio de Janeiro. Brazil. 212 p. https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Manual+de+Metodos_000fzvhotqk02wx5ok0q43a0ram31wtr.pdf
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2009. *Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar*. Rio de Janeiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 55 p. https://www.researchgate.net/publication/301624955_Zoneamento_Agroecologico_da_Cana-de_Acucar_Expandir_a_producao_preservar_a_vida_garantir_o_futuro
- Inman-Bamber, N. G. 2004. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Research*. 89(1), 107-122. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1016/j.fcr.2004.01.018>
- Inman-Bamber, N. G.; Smith, D. M. 2005. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research*. 92(2-3), 185-202. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.023>
- Machado, R.S.; Ribeiro, R. V.; Ribeiro-Marchiori, P. E.; São Pedro-Machado, D. F.; Caruso-Machado, E.; de Andrade-Landell, M. G. 2009. Biometric and physiological responses to water deficit in sugarcane at different phenological stages. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 44(12), 1575-1582. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009001200003>
- Oliveira, E. C.; Freire, F. J.; Oliveira, A. C.; Neto, D. E. S.; Rocha, A. T.; Carvalho, L. A. 2011. Productivity, water use efficiency, and technological quality of sugarcane subjected to different water regimes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46(6), 617-625. <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/10222>
- Rijtema, P.E.; Aboukhaled, A. 1975. *Crop Water Use*. p. 5. In: Aboukhaled, A.; Arar, A.; Balba, A.M.; Bishay, B.G.; Kadry, L.T.; Rijtema, P. E.; Taher, A. *Research on crop water use, salt affected soils and drainage in the Arab Republic of Egypt*. FAO Regional Office for the Near East, 104 p. <https://edepot.wur.nl/370376>
- Silva, M. A.; Jeronimo, E. M.; Lucio, A. D. 2008. Height of cut and harvest period effects on tillering and yield of sugarcane. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(8), 979-986. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800005>
- Silva, V.P.R.; Silva, B.B.; Albuquerque, W.G.; Borges, C.J.R.; Sousa, I.F.; Dantas Neto, J. 2013. Crop coefficient, water requirements, yield and water use efficiency of sugarcane growth in Brazil. *Agricultural Water Management*. 128, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.06.007>
- Singels, A.; Van Den Berg, M.; Smit, M. A.; Jones, M. R.; Van Antwerpen, R. 2010. Modelling water uptake, growth and sucrose accumulation of sugarcane subjected to water stress. *Field Crops Research*.

- 117(1), 59-69. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1016/j.fcr.2010.02.003>
- SEAB. Secretaria da agricultura e do abastecimento. 2015. *Prognosis of sugarcane 2014/2015*. Departamento de Economia Rural. URL: <http://www.agricultura.pr.gov.br>
- Souza, J. L. M.; Jerszurki, D.; Damazio, E. C. 2013. Functional relations between probable and average rainfall in Brazilian regions and climates. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 48(7), 693-702. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000700001>
- Thorntwaite, C. W.; Mather, J. R. 1955. *The Water Balance*. Drexel Institute of Technology, Laboratory of Climatology, Hydrometeorology. 104 p.
- Van Genuchten, M. 1980. A closed-form equation for predicting the conductivity of unsaturated soils. *Soil Science Society of American Journal*. 44(5), 892-898. <https://doi.org/10.2136/sssaj1980.03615995004400050002x>
- Vianna, M. S.; Sentelhas, P. C. 2014. Simulation of the water deficit risk in sugarcane-crop expansion regions in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 49(4): 237-246. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000400001>
- Wrege, M. S.; Caramori, P. H. C.; Gonçalves, A.; Bertanha, A.; Ferreira, R. C.; Caviglione, J. H.; Faria, R. T.; Lourenço, P. S.; Gonçalves, S L. 2005. Potential regions for sugarcane cultivation in the State of Paraná, Brazil, based on frost risk analysis. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*. 13(1), 113-122. https://www.esalq.usp.br/departamentos/leb/aulas/lce630_ANTIGA_SENTELHAS/EC_2_2016_2_ZonCana.pdf

Valoración genética de unidades comportamentales en una ganadería de lidia colombiana

Genetic evaluation of behavioral units in a Colombian bullfighting cattle raising

David Calero Quintero ¹, José Reinel Uribe Ceballos ², Daniel José Bartolomé Rodríguez ³, Jaime Eduardo Muñoz Flores ⁴, María Fernanda González Valencia ⁵

¹Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira. Colombia. ✉ ndcaleroq@unal.edu.co

²Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira. Colombia. ✉ jruribec@unal.edu.co

³Instituto Tecnológico Agrario. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería. Finca Zamadueñas, Valladolid. España. ✉ dp2dbr@gmail.com

⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Colombia. ✉ jemunozf@unal.edu.co

⁵Ganadería "Ernesto González Caicedo". Popayán, Cauca, Colombia. ✉ nandagonzalezv@yahoo.com

Rec.: 07-06-2019 Acep.: 30-01-2020

Resumen

Se diseñó un etograma para desagregar el comportamiento del ganado de lidia, cuantificar la bravura y consolidar la selección. Se analizaron 933 hembras y 787 machos de la ganadería colombiana "Ernesto González Caicedo" (EGC), encaste Santa Coloma, en Popayán, Cauca, Colombia. Las unidades comportamentales (UC) identificadas fueron fijeza (FIJ), distancia de arrancada (DIS), prontitud (PRO), recargar (RGR), ausencia de dolor (DOL), grado de encelamiento (GEN), recorrido (RDO), humillar (HUM), repetir (REP), tipo de embestida (TEM), fondo (FON), fuerza (FZA) y ausencia de defectos (AUD). La información se analizó con el software DeLidia®, desarrollado para esta investigación. Las UC se ajustaron según el efecto de la edad, consanguinidad, peso, sexo, lugar, tipo de festejo, número de varas, torero y picador. Se estimaron índices de herencia, correlaciones fenotípicas y genéticas y valores de cría de sementales. Los valores resultantes de h^2 para la UC FZA y REP fueron de 0.06 ± 0.03 y 0.36 ± 0.026 , respectivamente, con un promedio de 0.21 ± 0.05 para todas las UC. Todas las rg fueron positivas a excepción de las involucradas con FZA. El valor positivo más bajo de rg fue de 0.1 para GEN y HUM, mientras el más alto fue de 0.79 para FIJ y RDO. Las tendencias de los VG fueron positivas y diferentes de cero ($P < 0.01$), excepto FZA (-0.004 ± 0.0004). Las ganancias por año, como parte porcentual de la media, estuvieron entre -0.191% para FZA y 1.024% para REP. Los resultados encontrados para h^2 y VG en este estudio sugieren su utilidad en programas de selección, favoreciendo un mayor progreso genético

Palabras clave: Correlación genética; Etograma; Etología; Heredabilidad; Unidades comportamentales; Valores genéticos

Abstract

An ethogram was designed to disaggregate the behaviour of fighting cattle, quantify bravery and consolidate selection. 933 females and 787 males from the Colombian cattle ranch "Ernesto González Caicedo" (EGC), Santa Coloma lineage, at Popayán, Cauca, Colombia, were analysed. The behavioral units (UC) identified were fixity (FIJ), starting distance (DIS), readiness (PRO), reloading (RGR), absence of pain (DOL), degree of jealousy (GEN), distance (RDO), humiliating (HUM), repeat (REP), lunge type (TEM), bottom (FON), strength (FZA) and absence of defects (AUD). Information was analysed with DeLidia® software, developed for this research. The UC were adjusted according to the effect of age, consanguinity, weight, sex, place, type of celebration, number of rods, bullfighter and picador. Inheritance indices, phenotypic and genetic correlations, and breeding values of stallions were estimated. The resulting h^2 values for the UC FZA and REP were 0.06 ± 0.03 and 0.36 ± 0.026 , respectively, with an average of 0.21 ± 0.05 for all UC. All rg were positive except for those involved with FZA. The lowest positive value of rg was 0.1 for GEN and HUM, while the highest was 0.79 for FIJ and RDO. Trends of VG were positive and different from zero ($P < 0.01$), except FZA (-0.004 ± 0.0004). The gain per year, as a percentage part of the mean, was -0.191% for FZA and 1.024% for REP. Resultant h^2 and VG suggest their usefulness in selection programs, favouring greater genetic progress.

Key words: Behavior traits; Breeding values; Ethogram; Ethology; Heritability; Genetic correlation.

Introducción

Durante más de dos siglos la selección del ganado de lidia se ha basado en la respuesta de los animales frente a los diversos estímulos planteados a lo largo de las faenas de tienta y de lidia, considerando principalmente las posturas del animal observadas frente al caballo del picador y la muleta del torero. Los métodos empleados en la mayoría de fincas ganaderas de lidia continúan basando la selección en medidas conceptuales, apoyándose en las reseñas escritas tomadas por el ganadero al momento de torear las reses. En consecuencia, las calificaciones generadas tienen un alto componente subjetivo, debido a la dificultad de cuantificar los resultados del comportamiento de las reses (Calero Quintero, 2008).

La bravura, muchas veces no comprendida por el aficionado, no es una variable individual, sino, más bien, un concepto que debe ser desagregado para su correcta apreciación, ya que está compuesta por un número de características que, expresadas en diferentes grados, hacen de cada animal un ser único e irrepetible. La manifestación de estos fenotipos durante las faenas de tienta o de lidia no se debe solamente a los genes que porta el animal, existiendo otros factores no genéticos que afectan la expresión de estas variables, entre ellas: el sexo, el peso a la lidia, el coeficiente de consanguinidad, el lugar y tipo de espectáculo —tienta, corrida de toros, novillada picada o sin picar, el torero responsable de su lidia, el picador y número de varas recibidas, y un número considerable de otros factores—.

Cuando se observa el comportamiento del toro en plaza, surgen varios interrogantes sobre lo que hace el animal en el ruedo. Todos estos cuestionamientos, aunque parezcan sencillos, son de gran importancia y constituyen el primer paso para una investigación etológica en la especie. Existe una serie de reacciones sucesivas que ocurren de forma rápida y por tanto es posible pasar por alto detalles que son fundamentales, entre ellos: el arranque de largo, la prontitud, la manera de galopar, la forma de empujar en el peto y su grado de encelamiento en el caballo, la posición de la cabeza al embestir, la longitud del recorrido, la repetición de las embestidas, la ausencia de caídas, la manifestación de querencias, la transmisión o alegría de sus embestidas y su fondo de bravura.

La etología, rama de la biología que estudia el comportamiento animal, está cobrando cada vez más importancia en la ganadería brava, convirtiéndose en una valiosa herramienta para dar respuesta a los interrogantes relacionados con el comportamiento del toro en el ruedo. El

principal producto del toro de lidia es su bravura, por lo que el ganadero contemporáneo no debe desligarse del entorno en el que ésta se desarrolla (Zerda Ordoñez, 2004). Las explotaciones de carne y leche han ido perfeccionando los sistemas, no sólo en favor de un incremento en la producción, sino también en su calidad; de igual forma, es importante registrar el comportamiento de las reses de lidia de manera ordenada, de tal manera que permita una cuantificación de la bravura con mayor precisión, tanto en el incremento de cada una de las variables que la conforman, como en la expresión de la mejor versión de cada una de ellas.

Desde 1998 el Programa de Investigación del Toro de Lidia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, ha realizado estudios sobre el comportamiento para evaluaciones genéticas, desagregando la bravura en sus diferentes unidades comportamentales. Este trabajo se realiza de manera sistemática en cuatro ganaderías colombianas y los resultados muestran la importancia de realizar nuevas investigaciones sobre el tema, involucrando diversos encastes, además de ajustar las metodologías empleadas en la valoración de los caracteres de comportamiento de los ejemplares.

Para aumentar la precisión de la valoración de los animales se desarrollaron varios etogramas que permiten medir con mayor exactitud las unidades de comportamiento observadas durante las faenas de tienta y de lidia, dando mayor confiabilidad en la estimación de las frecuencias fenotípicas, índices de herencia y correlaciones fenotípicas y genéticas entre las variables, mejorando la valoración genética tanto de hembras como de machos con el fin de seleccionar los individuos superiores y conseguir, de esta forma, avances genéticos dentro de la explotación ganadera.

Materiales y métodos

La información analizada para la ganadería de encaste Santacoloma fue recopilada en su totalidad de los registros de la propiedad de Ernesto González Caicedo (EGC). Para estimar los parámetros genéticos y los valores de cría se empleó la información recopilada en los libros de tientas y lidias de las ganaderías Las Mercedes, Sierra Morena y Ernesto González Caicedo. También se utilizaron 4409 folios duplicados fotográficamente con los registros de 789 vacas de vientre y 112 sementales.

Los animales evaluados comprendieron un período de 41 años, entre 1970 y 2011. Solo se emplearon individuos evaluados por el propietario, el último de ellos en diciembre de 2011, fecha a partir de la cual se cambió el

evaluador. Los registros utilizados incluyeron inicialmente 1720 animales, siendo 787 machos y 933 hembras.

La información básica de cada individuo incluyó: el sexo, la fecha de nacimiento, el número y el nombre del ejemplar de sus padres, la fecha de tiente o lidia, la edad a la lidia, el peso a la lidia en el caso de los machos y el coeficiente de consanguinidad.

Como efectos fijos se tuvieron aquellos propios de la tiente o lidia: lugar, tipo de evento o espectáculo, peso a la lidia en el caso de los machos, número de varas, matador y picador (solo en hembras), incluyendo ajustes en aquellos que resultaron significativos en cada variable. Toda la información fue almacenada y procesada en el software ganadero DeLidia (Calero Quintero y Uribe Ceballos, 2015) con el cual se evaluó el comportamiento de los animales mediante el uso de etogramas DL-EST y DL-ESL.

La estimación de los parámetros y valores genéticos se realizó sobre las observaciones de las unidades comportamentales para la tiente y la lidia, incluyendo los efectos fijos de sexo, varas, festejo, lugar, torero y las covariables edad, consanguinidad y peso, además del efecto aleatorio del animal. Los análisis se realizaron por el procedimiento de máxima verosimilitud restringida libre de derivadas mediante el software MTDFREML desarrollado por Boldman et al. (1995). El modelo propuesto (Ecuación 1), fue el siguiente:

$$y = X\beta + Z\alpha + \varepsilon \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, y = vector de las unidades comportamentales observadas; X = es la matriz de incidencia que relacionan los efectos fijos con las características de comportamiento; β = vector de los efectos fijos de sexo, torero, picador, lugar, tipo de espectáculo, consanguinidad y edad a la tiente o lidia, para las unidades comportamentales; Z = es la matriz de incidencia que relaciona el efecto aleatorio de animal con los valores genéticos a ser calculados (Predichos); α = es el vector desconocido de efectos aleatorios; ε = es el vector de residuos.

Las heredabilidades se obtuvieron mediante análisis uni-característicos, empleando la Ecuación 2:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_e^2} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde, h^2 = heredabilidad de la unidad comportamental; σ_a^2 = varianza genética aditiva; σ_e^2 = varianza ambiental.

En la Tabla 1 se incluye la nomenclatura y la definición de las variables consideradas en el estudio y en la Tabla 2 la clasificación empleada para los índices de herencia de las características puntuales de comportamiento.

Las correlaciones fenotípicas, genéticas y ambientales para las unidades comportamentales observadas durante la tiente y la lidia fueron estimadas mediante análisis bi-característicos, utilizando para todos los mismos efectos fijos.

Para estimar las correlaciones fenotípicas se utilizó la Ecuación 3 propuesta por Falconer y Mackay (2001), de la forma siguiente.

$$r_{P(X,Y)} = \frac{Cov_P(X,Y)}{\sqrt{\sigma_p^2(X) \times \sigma_p^2(Y)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde: $r_{P(X,Y)}$ = correlación fenotípica entre las unidades comportamentales X y Y ; $Cov_P(X,Y)$ = covarianza fenotípica entre las unidades comportamentales X y Y ; $\sigma_p^2(X)$ = varianza fenotípica de la unidad comportamental X ; $\sigma_p^2(Y)$ = varianza fenotípica de la unidad comportamental Y .

Las correlaciones genéticas se estimaron mediante la Ecuación 4:

$$r_{G(X,Y)} = \frac{Cov_A(X,Y)}{\sqrt{\sigma_A^2(X) \times \sigma_A^2(Y)}} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde: $r_{G(X,Y)}$ = correlación genética entre las unidades comportamentales X y Y ; $Cov_A(X,Y)$ = covarianza genética aditiva entre las unidades comportamentales X y Y ; $\sigma_A^2(X)$ = varianza genética aditiva de la unidad comportamental X ; $\sigma_A^2(Y)$ = varianza genética aditiva de la unidad comportamental Y .

En el Tabla 3 se incluye la clasificación utilizada en los coeficientes de correlación para las unidades comportamentales.

Para la estimar los valores genéticos de los animales en las unidades comportamentales, la información fue analizada por el método del mejor predictor lineal insesgado (BLUP), ajustando los registros por aquellos efectos fijos que resultaron significativos ($P < 0.05$), como lo indican Saxton (2004), Searle (2012), Quass et al., (1984), Henderson (1963, 1973, 1974, 1975, 1990) y Littell et al. (1996).

Tabla 1. Definición de variables etológicas en unidades comportamentales comunes en la tiente y la lidia de reses bravas.

Variable	Definición
FIJ	Fijeza
DIS	Distancia arrancada
PRO	Prontitud
RGR	Recargar
DOL	Ausencia dolor
GEN	Grado encelamiento
RDO	Recorrido
HUM	Humillar
REP	Repetir
TEM	Tipo embestida
FON	Fondo
FZA	Fuerza
AUD	Ausencia defectos
GE	Global estudio
GG	Global ganadero

Tabla 2. Clasificación de los índices de herencia*. Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

Clasificación	Heredabilidades (h^2)
Muy baja	< 0.05
Baja	0.05 a 0.2
Moderada	0.2 a 0.4
Alta	0.4 a 0.6
Muy alta	0.6 a 1.0

*Cardellino y Rovira (1987), Steel y Torrie (1997).

Tabla 3. Clasificación de los coeficientes para correlaciones fenotípicas y genéticas*. Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

Clasificación	Correlación positiva (+)	Correlación negativa (-)
Muy baja	0 - 0.05	0 - 0.05
Baja	+0.05 a + 0.2	-0.05 - 0.2
Moderada	+0.2 a + 0.4	-0.2 - 0.4
Alta	+0.4 a + 0.6	-0.4 - 0.6
Muy alta	+0.6 a + 1	-0.6 - 1

*Cardellino y Rovira (1987), Steel y Torrie (1997).

Resultados y discusión

Heredabilidades de las unidades comportamentales

Los valores de h^2 encontrados en esta ganadería para las UC analizadas en las faenas de tiente y lidia estuvieron en el rango entre muy bajos a moderados, tanto para hembras como para machos separados y para la población total. Si se observan los resultados obtenidos en la tiente para las hembras, el mayor valor alcanzado fue para REP con 0.35, seguido de HUM y FIJ con

valores de 0.30 y 0.23, respectivamente. Los valores más bajos se obtuvieron en las variables DIS con 0.01, seguido por AUD con 0.09 y RGR, FON y FZA con valores iguales (0.12). Las notas del estudio y del ganadero presentaron valores de h^2 muy similares con 0.23 y 0.24 para GE y GG, respectivamente. En la Tabla 4 se incluyen todos los valores de h^2 y los errores estándar para las UC en esta ganadería.

Durante la lidia, las UC de los machos, al igual que en las hembras, presentaron valores entre muy bajos y moderados. El valor más alto fue de 0.39 para REP, considerado como moderado, seguido por valores de h^2 también moderados para PRO (0.35), RGR (0.30) y HUM (0.29). En la categoría muy baja aparecen AUD con 0.02 y FZA con 0.04, seguidas por DOL con 0.07, considerada como baja. Las notas del estudio y del ganadero, ambas moderadas, presentaron valores h^2 de 0.34 y 0.21. En la Tabla 4 también se incluyen todos los valores de h^2 y errores estándar para las UC de hembras y machos en esta ganadería. Al comparar los valores h^2 en las UC para ambos sexos, se observan diferencias muy bajas (<0.05) para FIJ, DOL, GEN, RDO, HUM, REP, TEM y GG; diferencias bajas (>0.05 a 0.10) en FON, AUD y FZA; diferencias moderadas (>0.10 a 0.15) para DIS y GE; y diferencias altas (>0.15 a 0.20) para PRO y RGR.

Resultados similares a los encontrados en este estudio fueron reportados por Calero et al. (2009 a y b) en la misma ganadería, empleando el método de evaluación por reseña (MER) y estimando la heredabilidad por hermanos medios paternos. Las UC evaluadas durante la tiente de hembras fueron RGR (0.13 y 0.12), DIS (0.02 y 0.01) y REP (0.34 y 0.35). En los machos lidiados las UC más parecidas fueron RGR (0.33 y 0.30), DIS (0.19 y 0.16), HUM (0.27 y 0.29) y GG (0.24 y 0.21). En la Tabla 5 se incluyen los valores h^2 para las variables etológicas comunes a machos y hembras, determinados de manera conjunta. Primero fueron calculados de manera independiente para determinar las tendencias de cada una de las variables aislando el efecto de sexo y el tipo de lidia que conlleva cada uno. Cuando se trabaja de esta manera, se observa claramente que los estimados tienden de alguna forma a normalizarse bajando en algunos casos o ubicándose en algún valor del rango de los índices de hembras y machos, excepto en los casos DIS, RDO y TEM, donde superan los valores de ambos sexos. Los valores encontrados estuvieron entre muy bajos a moderados, siendo los más altos REP (0.36), HUM (0.27) y RDO (0.26). Los valores de h^2 más bajos se presentaron en DOL (0.04), FZA (0.06) y RGR (0.09). Las notas finales tuvieron valores de h^2 aproximados con 0.27 para GE y 0.23 para GG. Al comparar estos resultados con

Tabla 4. Heredabilidades, errores estándar y diferencias entre sexos de unidades comportamentales comunes en la tiente y la lidia (n=1720)*. Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

VAR.	Hembras (n=933)		Machos (n=787)		Diferencias	Sexo a favor
	h ²	EE	h ²	EE		
FIJ	0.23	0.069	0.27	0.092	0.04	M
DIS	0.01	0.027	0.16	0.086	0.15	M
PRO	0.17	0.061	0.35	0.109	0.18	M
RGR	0.12	0.062	0.30	0.108	0.12	M
DOL	0.09	0.053	0.07	0.053	0.02	H
GEN	0.15	0.056	0.20	0.097	0.05	M
RDO	0.22	0.070	0.22	0.090	0.00	A
HUM	0.30	0.072	0.29	0.099	0.01	H
REP	0.35	0.077	0.39	0.106	0.04	M
TEM	0.17	0.061	0.18	0.086	0.01	M
FON	0.12	0.053	0.20	0.087	0.08	M
FZA	0.12	0.057	0.04	0.042	0.08	H
AUD	0.09	0.056	0.02	0.041	0.07	H
GE	0.23	0.065	0.34	0.100	0.11	M
GG	0.24	0.071	0.21	0.084	0.04	H

Tabla 5. Heredabilidades, errores estándar y diferencias con alguno de los sexos de las unidades comportamentales en conjunto para hembras y machos de la ganadería EGC (n=1720). Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

VAR.	Conjunto (n=1720)		Dif. con sexos*
	h ²	EE	
FIJ	0.24	0.051	E
DIS	0.17	0.052	>
PRO	0.20	0.047	E
RGR	0.09	0.050	<
DOL	0.04	0.049	<
GEN	0.12	0.076	<
RDO	0.26	0.052	>
HUM	0.27	0.053	E
REP	0.36	0.056	E
TEM	0.22	0.051	>
FON	0.15	0.042	E
FZA	0.06	0.032	E
AUD	0.12	0.045	E
FZA	0.06	0.032	E
GE	0.27	0.051	E
GG	0.23	0.051	E

E: Entre alguno de los sexos; <: Menor que alguno de los sexos; >: Mayor que alguno de los sexos; I: Igual que alguno de los sexos.

los encontrados por Cañón (2009) se observan diferencias muy bajas ($P \leq 0.05$) en las unidades FIJ (0.22 y 0.24), RDO (0.28 y 0.26), HUM (0.32 y 0.27) y TEM (0.27 y 0.22).

Los diferentes factores del medioambiente propios de la tiente y de las diversas modalidades de lidia afectan, en mayor o menor grado, los valores de las varianzas ambientales, resultando

diferencias de h^2 clasificadas de moderadas a altas para algunas de las unidades comportamentales comunes a hembras y machos. No obstante, aunque se ha especulado que al reducir al máximo las diferencias existentes en las maneras de realizar la tiente y la lidia, es posible obtener resultados estimados de h^2 similares, aún la respuesta sigue siendo incierta, ya que en un ambiente tan ‘controlado’ como el de los tentaderos seguirán ejerciendo presión aquellos factores no genéticos propios del tipo de faena.

Aunque el ganadero puede tener una especie de guion establecido previamente sobre la forma de efectuar la tiente, tratando de reducir al máximo el ruido producido por los diferentes factores externos y en la mayoría de las veces ésta se realiza en un mismo lugar (generalmente la plaza de la ganadería), en algunas ocasiones en algunas zonas las condiciones externas han forzado a los ganaderos a salir de sus explotaciones y realizar la selección en ruedos de otras plazas, afectando aún más la variación en el factor plaza. En el caso de machos es imposible controlar esta situación especial, ya que la lidia puede ocurrir en cualquier lugar.

Otra forma de controlar el ambiente es proporcionando a los animales las mismas condiciones en el momento de la tiente, entre otras: en lo posible, tratar de emplear las mismas distancias en los cites al caballo y la muleta; suministrar igual número de varas; y propinar igual número de series y muletazos. Aun ejerciendo este tipo de control siempre existirá algún factor que dificulte realizar la faena lo más ceñida posible al guion propuesto. Las reacciones del animal, los efectos de clima como un exceso de calor o de lluvia, la nutrición del animal, el factor humano como la disposición del matador o el picador al momento de realizar la tiente y aún la dirección de la misma por el propio ganadero, están sujetos a ciertas variantes muy difíciles de controlar.

Es necesario señalar que valores bajos o altos en los índices de herencia no se traducen en estas mismas proporciones para las respectivas frecuencias fenotípicas. Por ejemplo, los pesos al destete en ganado de carne en rebaños especializados muchas veces alcanzan promedios de producción muy altos (270 kg, o superiores a los 9 meses de edad), sin embargo, el valor de h^2 de esta característica es aproximadamente de 0.25, considerada como moderada.

Correlaciones

La correlación fenotípica observada es aquella que se puede calcular directamente entre dos caracteres. Esta correlación no es necesariamente genética, lo cual quiere decir que, aunque haya una correlación fenotípica positiva entre dos

variables, la selección por una no resultará necesariamente en una respuesta o ganancia genética por la otra. Así mismo, una correlación fenotípica igual a cero no indica una total independencia genética entre las variables. La dependencia genética está dada por la correlación genética entre las dos variables (Elzo y Cerón Muñoz, 2008).

Correlaciones genéticas altas y positivas (rg) indican un alto grado de asociación de los genes responsables de ambas características comparadas, permitiendo que al seleccionar una de ellas se obtenga una respuesta favorable de la otra. Cuando estas correlaciones son negativas o cercanas a cero indican que al seleccionar una característica determinada no se está mejorando la otra; incluso, ésta puede desmejorarse dentro de la ganadería (Elzo y Cerón Muñoz, 2008).

Al analizar únicamente la información correspondiente a unidades comportamentales sin tener en cuenta las notas (GE y GG) se observa que, de las 78 parejas posibles 37 tienen valores de rg por encima de los considerados como muy altos, de los cuales 23 se encuentran por encima de 0.7, siendo el mayor para FIJ-RDO con 0.79. La fijeza (FIJ) se refiere a la ausencia de distracciones, permite al animal seguir el trazo que el torero va marcando con sus brazos al correr los engaños y se traduce en el recorrido del animal (RDO), siendo lo ideal que éste sea lo más largo posible, quizás uno o dos pasos más de lo que el brazo marca, para permitir al matador girar sobre su cuerpo y quedar listo para la siguiente embestida. Sin embargo, el valor de rp para este par de UC es de 0.55, lo que denota una alta influencia de factores ambientales en su expresión, como podrían ser el torero, o un exceso de peso que influye considerablemente en la capacidad para desplazarse. La FIJ presentó igualmente valores muy altos de rg (0.76) cuando se correlaciona con REP

El valor rg entre PRO-REP (0.74) fue muy alto, con cierta similitud entre ambas variables ya que denotan cierto grado de rapidez del animal. Esta rapidez, en el caso de PRO consiste en acudir sin demora al llamado y en el caso de REP consiste en embestir repetidamente, sin pausas ni demoras, una vez se le ha instrumentado el primer pase de cada serie tanto en el capote como en la muleta. La PRO presenta también valores altos con DIS, RDO, TEM y FON (0.60, 0.51, 0.57 y 0.60, respectivamente). El conjunto REP-TEM, por su parte, presentó un valor alto (0.73), ambas UC están relacionadas con cierta facilidad de movimiento del animal.

Es posible señalar que parte de los genes involucrados en las variables antes mencionadas son responsables del comportamiento del

animal para estar listo al ataque a la más mínima provocación, indicando también cierto grado de pleiotropía.

Las variables consideradas tradicionalmente como responsables en gran medida de la toreabilidad del animal son: FIJ, RDO y HUM. Esta última presenta valores moderados y altos de rg con las dos primeras (0.45 y 0.51, respectivamente) y valores de rp de 0.41 y 0.40. El valor de rg entre FIJ y RDO es alto (0.79) e igualmente alto el de rp (0.55). La FIJ presenta valores rg de moderados a muy altos con la mayoría de variables, excepto con fuerza ($rg = -0.44$) y ejerce una influencia grande en el recorrido, ya que individuos con un alto valor de esta característica generalmente se desplazan mejor que los distraídos. Argumentos similares pueden ser utilizados al correlacionar esta variable con FON, donde los valores de rg y rp presentaron valores de 0.77 y 0.59; de lo anterior se deduce que ejemplares con un alto grado de FIJ permiten a los toreros permanecer más tiempo delante de ellos.

El Fondo (FON), que hace referencia al tiempo que el animal permanece conservando la bravura y la toreabilidad, está fuertemente asociado también con RDO (0.74) y REP (0.73), siendo altos sus valores de rp (0.52 y 0.51, respectivamente). Estas unidades comportamentales son altamente trascendentales para que el individuo continúe embistiendo sin decaer el tiempo o duración de la faena.

En la Tabla 6 se incluyen las correlaciones fenotípicas (rp) bajo la diagonal, las genéticas (rg) sobre la diagonal y los valores de h^2 en la diagonal de las diferentes unidades comportamentales comunes en la tiente y la lidia, estimadas de manera conjunta para hembras y machos.

Las correlaciones de todo tipo con la variable FZA dieron en su mayoría valores negativos, alcanzando los valores de rg más altos con DOL (-0.53), seguidos por FIJ (0.44), GEN y FON (-0.40 ambas), todos dentro de rangos considerados negativamente altos y moderados. Los valores de rp para estos conjuntos fueron, respectivamente, de -0.08, -0.15, -0.02 y -0.07. El único valor positivo de FZA fue con TEM (0.04), considerado muy bajo.

Cuando se correlacionan genéticamente las variables GE y GG con las diferentes unidades comportamentales, se observa como todos los estimados presentaron valores entre altos y muy altos, a excepción de RGR (0.47 y 0.46), GEN (0.51 y 0.45) y HUM (0.56 y 0.53) que fueron moderados. La fuerza presentó valores negativos de -0.33 y -0.32. Estos resultados sugieren que posiblemente los genes responsables de la

Tabla 6. Correlaciones genéticas (sobre la diagonal), fenotípicas (bajo la diagonal) y heredabilidades (en la diagonal) de unidades comportamentales en conjunto para hembras y machos (n=1720)*. Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

Var.	FIJ	DIS	PRO	RGR	DOL	GEN	RDO	HUM	REP	TEM	FON	FZA	AUD	GE	GG
FIJ	0.24	0.39	0.65	0.28	0.55	0.34	0.79	0.45	0.76	0.69	0.77	-0.44	0.55	0.78	0.75
DIS	0.42	0.17	0.60	0.32	0.55	0.49	0.34	0.32	0.55	0.39	0.60	-0.24	0.66	0.75	0.76
PRO	0.30	0.51	0.20	0.27	0.59	0.41	0.51	0.24	0.74	0.57	0.60	-0.34	0.48	0.78	0.73
RGR	0.22	0.24	0.17	0.09	0.35	0.26	0.28	0.17	0.30	0.23	0.44	-0.31	0.43	0.47	0.46
DOL	0.16	0.09	0.06	0.55	0.04	0.69	0.45	0.23	0.55	0.52	0.59	-0.53	0.49	0.67	0.64
GEN	0.22	0.19	0.11	0.55	0.52	0.12	0.19	0.10	0.38	0.31	0.35	-0.40	0.36	0.51	0.45
RDO	0.55	0.28	0.16	0.14	0.15	0.14	0.26	0.51	0.64	0.62	0.74	-0.31	0.55	0.69	0.68
HUM	0.41	0.23	0.14	0.22	0.13	0.13	0.40	0.27	0.43	0.48	0.53	-0.07	0.48	0.56	0.53
REP	0.52	0.55	0.54	0.31	0.15	0.26	0.30	0.27	0.36	0.73	0.73	-0.30	0.59	0.83	0.78
TEM	0.47	0.50	0.33	0.32	0.13	0.2	0.33	0.35	0.52	0.22	0.67	-0.15	0.53	0.75	0.71
FON	0.59	0.48	0.32	0.21	0.11	0.13	0.52	0.37	0.51	0.50	0.15	-0.40	0.74	0.83	0.83
FZA	-0.15	-0.06	-0.10	-0.03	-0.08	-0.02	-0.08	-0.06	-0.12	0.04	-0.07	0.06	-0.15	-0.33	-0.32
AUD	0.51	0.44	0.32	0.21	0.18	0.09	0.46	0.37	0.41	0.47	0.64	-0.05	0.12	0.74	0.76
GE	0.61	0.57	0.53	0.52	0.39	0.45	0.53	0.47	0.62	0.59	0.65	-0.01	0.61	0.27	0.95
GG	0.60	0.59	0.47	0.39	0.25	0.29	0.52	0.41	0.57	0.58	0.69	-0.05	0.67	0.87	0.23

toreabilidad y la clase en la embestida, no son los mismos que controlan la fuerza. Además, es posible deducir que las variables que conforman la toreadabilidad y la clase o el estilo del animal, respondan a efectos aditivos mientras que la fuerza responda a efectos no aditivos, lo cual se puede ratificar cuando se observan valores bajos de h^2 y coeficientes de regresión negativos con el coeficiente de consanguinidad. Resultados similares a los del presente trabajo fueron encontrados en un estudio realizado en las ganaderías españolas de Domecq-Solis (2010), con rg de -0.87 entre fuerza y nobleza (Cañon, 2010); mientras en otra investigación realizada en León, en España, se concluye que la falta de fuerza durante la lidia está estrechamente relacionada con acidosis ruminal (Bartolomé-Rodríguez, 2011). Las bajas h^2 encontradas para esta UC y la alta incidencia del síndrome de la caída o falta de fuerza en esta ganadería, sugieren que el manejo de la nutrición puede ser una de las principales causas de esta situación.

Los resultados de rg reportados por Calero en 2008 para los conjuntos de variables mencionados arriba, fueron de altos a muy altos, alcanzando valores de 0.63 (FIJ-RDO), 0.44 (FIJ-REP), 0.56 (PRO-REP), 0.52 (PRO-DIS), 0.37 (PRO-RDO), 0.11 (PRO-TEM) y 0.25 (PRO-FON), 0.46 (REP-TEM), 0.56 (FON-FIJ), 0.56 (FON-RDO) y 0.44 (FON-REP). Las diferencias existentes, al comparar estos valores con los del presente estudio, fueron bastante amplias y pueden deberse a que se utiliza la metodología de hermanos medios paternos, además de la evaluación por reseña (MER) y al tamaño de

la muestra. Las notas totales GE-GG tuvieron valores de rg y rp 0.95 y 0.87, respectivamente, lo que indica muy alto grado de confiabilidad de los procedimientos empleados.

Tendencias genéticas

Para estudiar la evolución en el tiempo de las UC consideradas en este estudio, se tomó un periodo de análisis de 40 años, comprendidos entre 1970 y 2010. En la Tabla 7 se presentan los intervalos de los VG predichos para las variables analizadas en la ganadería EGC durante las faenas de tienta y de lidia. Los valores medios de estas variables variaron entre -0.21 y 0.55 para TEM y DIS, respectivamente, con un promedio general de 0.093. Todas las tendencias de los VG fueron positivas y diferentes de cero, a excepción de FZA que presentó valores negativos (-0.004 ± 0.0004).

Las ganancias por año, estimadas por los coeficientes de regresión lineal (β , en la Tabla 7) presentaron valores entre -0.0040 y 0.0398 con un promedio de 0.0169, mientras las magnitudes de estas ganancias anuales, expresadas como porcentaje de la nota promedio de cada UC ($(\beta/y) \times 100$) estuvieron entre -0.191% para FZA y 1.024% para REP.

En la Figura 1 se observa que las tendencias de las variables PRO y DIS, con pendientes de 0.029 y 0.011, mantuvieron Valores Genéticos (VG) negativos hasta 1991 y 1995, respectivamente. La FIJ ($b = 0.031$), también en este grupo, presentó valores positivos durante todos los períodos, siendo la única variable con esta tendencia dentro de la ganadería. El valor más alto de VG (0.8493) lo presentó PRO en 2009.

Tabla 7. Soluciones BLUP de las UC observadas durante la tiente y la lidia*. Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

UC*	VG predichos		Tend. gen.		Prom.	Gma (%)	R ²	
	Min	Max	$\beta \pm EE$	Pr				
FIJ	-0.11	-1.54	1.15	0.031 \pm 0.002	<.0001	3.49	0.893	0.8509
DIS	0.55	-0.55	1.26	0.011 \pm 0.001	<.0001	3.37	0.328	0.7286
PRO	0.20	-1.26	1.22	0.029 \pm 0.002	<.0001	3.08	0.928	0.8832
RGR	0.10	-0.65	0.64	0.011 \pm 0.001	<.0001	3.60	0.313	0.7201
DOL	0.10	-0.45	0.40	0.009 \pm 0.001	<.0001	4.31	0.206	0.8858
GEN	0.11	-0.76	0.81	0.006 \pm 0.001	<.0001	2.46	0.240	0.6702
RDO	-0.05	-1.60	1.23	0.027 \pm 0.001	<.0001	3.85	0.696	0.8006
HUM	0.04	-1.91	1.03	0.007 \pm 0.002	<.001	3.97	0.169	0.2015
REP	0.06	-1.92	1.20	0.040 \pm 0.002	<.0001	3.88	1.024	0.9184
TEM	-0.21	-1.76	0.90	0.028 \pm 0.002	<.0001	3.24	0.870	0.8752
FON	0.16	-0.79	1.35	0.019 \pm 0.002	<.0001	2.61	0.742	0.8045
FZA	-0.04	-0.41	0.33	-0.004 \pm 0.000	<.0001	2.10	-0.191	0.7262
AUD	0.17	-0.61	0.71	0.008 \pm 0.001	<.0001	1.50	0.523	0.7761
GE	0.16	-0.75	0.81	0.019 \pm 0.001	<.0001	3.16	0.597	0.9224
GG	0.15	-0.63	0.69	0.013 \pm 0.001	<.0001	3.08	0.430	0.9205

Las variables RGR, DOL y GEN (Figura 2) corresponden al tercio de varas, muestran tendencia ascendente permanentemente, con valores negativos durante la primera década, momento en el que cambian los VG a positivos para todas ellas, siendo la serie de datos con valor más alto para RGR (2008, 0.3528). En el caso de RDO y REP (Figura 3) estos permanecen en negativo por un periodo aproximado de dos décadas (1991 y 1995), mientras HUM se mantiene con una tendencia muy plana, entre valores positivos y negativos muy cercanos a cero hasta 1999. Las tres UC alcanzaron sus VG más altos en 2009, con 0.7168 ($b = 0.027$), 0.6986 ($b = 0.040$) y 0.4331 ($b = 0.007$), respectivamente.

Las variables FON y FZA, con pendientes muy bajas (0.019 y -0.004) permanecen ambas con valores muy cercanos a cero, aproximadamente hasta 1990, cuando la primera inicia un notorio ascenso, llegando a su punto más alto en 2005, con 0.7132 de VG; mientras la segunda decrece de una forma casi imperceptible, llegando a valores bastante críticos (2008, -0.1288). La TEM es la UC que inicia con los VG negativos más bajos (1971, -0.7343) y aunque presenta una tendencia en ascenso bastante fuerte, solo pasa a valores positivos en 1995, llegando a su mejor VG en 2009 con 0.3980 (Figura 4). La GE y la GG, siempre con tendencias ascendentes, permanecieron con promedios negativos de VG hasta 1982 y 1984, con valores en b de 0.019 y 0.013, respectivamente, llegando en 2009 a sus valores máximos, con 0.5800 y 0.4716

Las diferencias existentes en las tendencias genéticas de las UC dentro de la ganadería en el presente estudio pueden ser atribuidas a diferencias en parámetros genéticos, objetivos de selección definidos por el propietario y

particularidades en la valoración aplicada a cada una de ellas. Como se observa en la Figura 5 la mayoría de ellas presentaron un comportamiento ascendente continuo durante todo el periodo analizado, con valores negativos inicialmente para todas, a excepción de FIJ que presentó valores positivos durante todos los periodos, siendo la única variable con esta tendencia dentro de la ganadería. Esta situación, que permaneció entre 10 y 15 años, puede tener explicación en dos momentos muy puntuales dentro de la explotación, en los que cambiaron los criterios de selección debido a nuevos manejos. El primero de ellos en 1970, correspondiente a la sucesión tras la muerte del fundador de la ganadería, poniendo fin a 24 años de manejo con otros esquemas de selección, momento en el que sus herederos asumen el control de la explotación, transición que dura 10 años. En 1979 se inicia una nueva etapa, dividiendo la ganadería en dos hierros: Salento (SAL) y Ernesto González (EGC). Durante esta fase, se realiza una migración de genes importantes, provenientes de hierros españoles, que será determinante en la estructura genética de la población.

Resultados similares a los encontrados en este estudio fueron reportados por Domínguez-Viveros et al. (2014) en un estudio realizado en cuatro ganaderías mexicanas, empleando pedigrís bien estructurados y completos que igualmente tuvieron origen en un reducido número de ancestros. Además, las evaluaciones del comportamiento no presentaban diferencias sustanciales en el tiempo debido a que fueron realizadas por la misma persona. El mismo autor manifiesta que las variables analizadas son controladas por loci autosómicos y que no se derivan de genes ligados al sexo.

Conclusiones

Dada su naturaleza, la evaluación del comportamiento siempre estará sometida a cierto grado de subjetividad. La evaluación del comportamiento en el ganado de lidia durante los tentaderos o en corridas de toros puede resultar una labor compleja, si se tiene en cuenta el alto número de características involucradas y sus diferentes matices.

Los múltiples factores ambientales que interactúan en las faenas de tienta y de lidia incrementan la dificultad en la selección, enmascarando en muchos casos la expresión fenotípica de algunas unidades comportamentales.

En el encaste estudiado se observaron heredabilidades de muy bajas a moderadas para las variables etológicas, y baja para fuerza debido a los efectos ambientales que ejercen gran influencia en los valores de sus varianzas.

Todos los valores de correlación genética entre la fuerza y las unidades comportamentales estudiadas fueron negativos. La fuerte presión de selección realizada sobre el resto de variables, especialmente sobre aquellas responsables de la toreabilidad y estilo, ha llevado a una reducción considerable en la fuerza de los animales. Esto se puede explicar si se considera que estas variables deben tener efecto aditivo, haciendo que su respuesta a la selección sea alta, lo que se confirma al observar sus frecuencias fenotípicas y los coeficientes de regresión respectivos, cuyos estimados fueron positivos y significativos.

El conocimiento de las tendencias genéticas en el tiempo es de vital importancia para el ganadero con el fin de valorar el progreso genético y el reajuste de criterios y objetivos de selección, permitiendo un cambio en la estructura genética de la población con el incremento esperado en las unidades comportamentales, basados en el uso de los VG predichos.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la ganadería Ernesto González Caicedo y a su actual administradora, María Fernanda González Valencia, por el suministro de la información, colaboración y disposición para la realización de esta investigación.

Referencias

- Bartolomé-Rodríguez, D. J. 2011. *Influencia de la acidosis ruminal en la caída y el comportamiento del toro bravo en la plaza*. Tesis doctoral. Universidad de León. León, España. 554p.
<https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1760/2008ON-BARTOLOM%C3%89%20RODR%C3%8DGUEZ,%20DANIEL%20J..pdf?sequence=1>

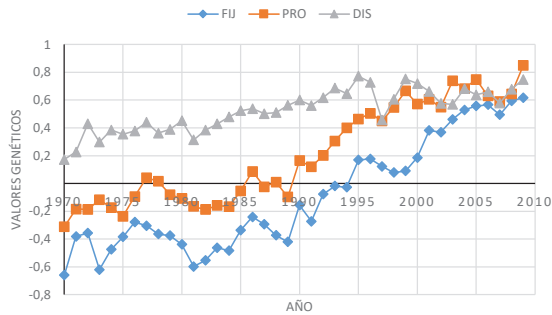


Figura 1. Tendencias genéticas de las UC fija, distancia y prontitud (Grupo 1). Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

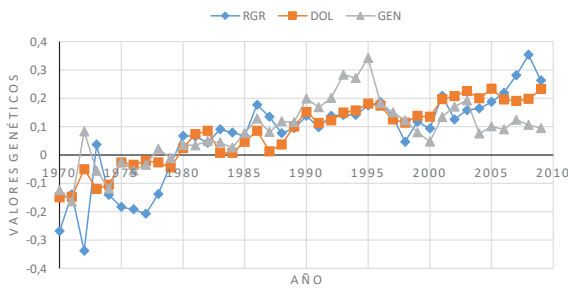


Figura 3. Tendencias genéticas de las UC recorrido, humillar y repetir (Grupo 3). Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

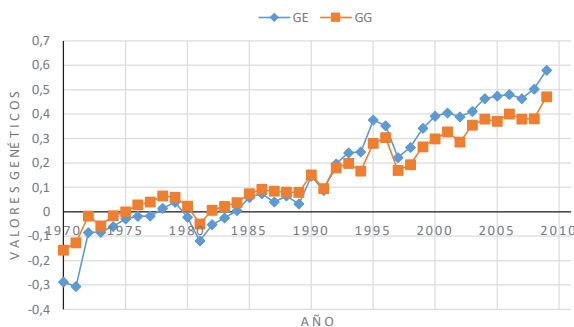


Figura 5. Tendencias genéticas de las notas globales del estudio y del ganadero. Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

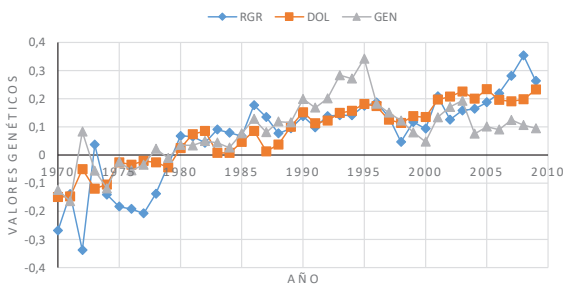


Figura 2. Tendencias genéticas de las UC recargar, ausencia de dolor y grado de encelamiento (Grupo 2). Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

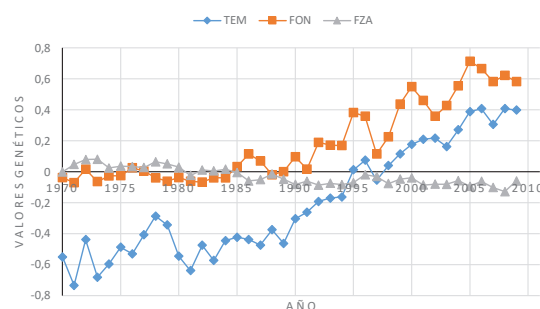


Figura 4. Tendencias genéticas de las UC tipo de embestida, fondo y fuerza (Grupo 4). Ganadería Ernesto González Caicedo, Popayán, Colombia.

- Boldman, K.; Kriese, L.; Van Vleck, D.; Van Tassell, C.; Kachman, S. 1995. *MTDFREML: Multiple-trait derivative-free restricted maximum likelihood*. USA: United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <https://aipl.arsusda.gov/software/mtdfreml/>
- Calero-Quintero, D. 2008. *Estimación de parámetros genéticos y valores de cría de variables etológicas expresadas durante las faenas de tiente y de lidia en dos ganaderías de reses bravas del sur-occidente colombiano*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira. 268 p. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2462>
- Calero Quintero, D., y Uribe Ceballos, J. R. 2015. DeLidia: Software para evaluación del comportamiento de ganado de lidia. Vol. 2.0.1508. P. d. Lidia, Ed. Universidad Nacional de Colombia. sede Palmira. Colombia.
- Calero Quintero, D., Durán Castro, C. V., y Uribe Ceballos José Reinol, J. R. 2009a. Estimación de heredabilidades en características etológicas expresadas durante la lidia en ganado de lidia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 22(3), 459. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902011000300028
- Calero Quintero, D., Durán Castro, C. V., y Uribe Ceballos, J. R. 2009b. Estimación de heredabilidades en características etológicas expresadas durante la tiente en ganado de lidia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(3), 460. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902011000300028
- Cañon, J. 2010. *Relaciones entre los caracteres de comportamiento del toro de lidia en las ganaderías de Juan Pedro Domecq*. p 381-408 En: Domecq-Solis, J. P. *Del toreo a la bravura*. Editorial Alianza. Madrid. España. 448 p.
- Cardellino, R.; Rovira, J. 1987. *Mejoramiento genético animal*. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. S.R.L. Montevideo, Uruguay. 392 p.
- Domecq Solis, J. P. 2010. *Del toreo a la bravura*. Editorial Alianza. Madrid. España. 448 p.
- Domínguez-Viveros, J.; Rodríguez-Almeida, F. A.; Nuñez-Domínguez, R.; Ramírez-Valverde, R.; Ruiz-Flores, A. 2014. Genetic parameters and genetic trends for behavior traits in Mexican bullfighting herds. *Rev. mex. de cienc. pecuarias*, 5(3), 261-271. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-11242014000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Elzo A, M.; Cerón-Muñoz, M. F. 2008. *Modelación aplicada a las ciencias animales: genética cuantitativa*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 188 p.
- Falconer, D. S.; Mackay, T. F. 2001. *Introduction to quantitative genetics*. 4ª edición. Editorial Benjamin-Cummings Pub Co. Londres, Reino Unido. 464 p.
- Henderson, C. R. 1963. *Selection index and expected genetic advance*. Statistical genetics and plant breeding. Statistical genetics and plant breeding. 982, 141-163. <http://morotalab.org/literature/pdf/henderson1963.pdf>
- Henderson, C. R. 1973. Sire evaluation and genetic trends. *Journal of Animal Science*. 1973 (Issue Symposium), 10-41. <https://doi.org/10.1093/ansci/1973.Symposium.10>
- Henderson, C. R. 1974. General flexibility of linear model techniques for sire evaluation. *Journal of Dairy Science*. 57(8), 963-972. [https://doi.org.ezproxy.unal.edu.co/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84993-3](https://doi.org.ezproxy.unal.edu.co/10.3168/jds.S0022-0302(74)84993-3)
- Henderson, C. R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*. 31(2), 423-447. <https://doi.org/10.2307/2529430>
- Henderson, C. R. 1990. *Statistical method in animal improvement: historical overview*. P 2-14. En: Gianola, D.; Hammond, K. *Advances in Statistical Methods for Genetic Improvement of Livestock*. 534 p. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-74487-7>
- Littell, R. C.; Milliken, G. A.; Stroup, W. W.; Wolfinger, R. D. 1996. *SAS System for Mixed Models*. Editorial SAS Institute, Incorporated. Cary, NC, USA. 663 p.
- Quass, R. L.; Anderson, R. D. 1984. *BLUP School Handbook: Use of Mixed Models for Prediction and for Estimation of Co Variance Components*. Editorial Animal Genetics and Breeding Unit, University of New England. NSW, Australia. 158 p. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19850186676>
- Saxton, A. M. 2004. *Genetic Analysis of Complex Traits Using SAS*. Editorial SAS Institute. Cary, NC, USA. 312 p.
- Searle, S. R. 2012. *Linear Models: Wiley Series in Probability and Statistics - Applied Probability and Statistics Section*. Editorial Wiley-Interscience. New York, US. 739 p.
- Steel, R. G.; Torrie, J. H. 1997. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 3ra edición. Editorial McGraw-Hill College. New York. 672 p.
- Zerda Ordoñez, E. 2004. *Comportamiento animal: Introducción, métodos y prácticas*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 389 p.

Caracterización morfo-anatómica y protocolo para estimar la viabilidad de semillas de *Psidium guajava*

Morpho-anatomical characterization and protocol to estimate the viability of *Psidium guajava* seeds

Jorge Ernesto Guevara Ohara ¹, Carlos Iván Cardozo Conde ¹, Luis Guillermo Santos Meléndez ¹

¹Universidad Nacional de Agricultura, Honduras. ✉ jeguevarao@unal.edu.co

²Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira, Colombia. ✉ cicardozoc@unal.edu.co

³Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). ✉ l.g.santos@cgiar.org

Rec: 25-05-2017 Acept: 11-02-2020

Resumen

Los estudios con guayaba (*Psidium guajava*) han estado orientadas principalmente a conocer la composición nutricional de los frutos y el uso de tratamientos pregerminativos para la liberación de latencia presente en la semilla de algunos materiales genéticos. No obstante, son escasos los protocolos para la determinación de viabilidad de la semilla; mediante el uso de tetrazolio como indicador. En el presente estudio, se caracterizó la composición morfo-anatómica de semilla de las variedades de *P. guajava* Palmira ICA-I, Cimpa Pulpa Roja, Manzana y CI-0440^a, de gran importancia económica para el Banco de Germoplasma en CORPOICA. Además, se realizó un ensayo factorial para determinar los efectos de la concentración y el tiempo de exposición a Tetrazolio y los efectos de la temperatura. Las semillas de este fruto tienen una testa de consistencia dura, lo cual no es impedimento para que se produzca el proceso de imbibición. Estas presentan diferentes formas (obovada, dentada, clavada, oblonga, ovoide y reniforme). El embrión es de tipo periférico y posee estructuras completamente desarrolladas al momento de la extracción de la semilla de frutos que presentan madurez fisiológica. Los diámetros, grosor y peso unidad (gramos/100 semillas) de la semilla de guayaba varían de acuerdo con la variedad, lo que probablemente está relacionado con el número de semillas que contiene cada fruto. El conocimiento de la concentración y tiempo de exposición de las semillas a Tetrazolio es de una alta importancia para la valoración de la calidad fisiológica de la semilla. La exposición a una concentración de 0.1% de este producto, durante 12 horas a 26 ± 2°C y 40% humedad relativa, y 1% durante 3 horas, en condiciones controladas de temperatura 40 °C permite la valoración segura de la calidad fisiológica de la semilla de esta especie.

Palabras clave: Calidad fisiológica; *P. guajava*; semillas; Tetrazolio; Viabilidad.

Abstract

Most research on *P. guajava* has been oriented to analyze nutritional composition of the fruits and some are related to the use of pre-germinative treatments for the release of seed dormancy in some genetic materials. However, no protocols have been developed that allow the determination of the viability of the seed; by using tetrazolium as an indicator. For the morfo-anatomical characterization of the *P. guajava* seed, four varieties of great economic importance for the CORPOICA Germplasm Bank were analyzed (Palmira ICA I, Cimpa Pulpa Roja, Manzana and CI-0440A). A factorial test was performed to determine the concentration of Tetrazolium, exposure time and temperature effects. Guava seeds have a hard consistency testa, which is not an impediment to the imbibition process. The seed exhibits different forms (oboved, dentate, nailed, oblong, ovoid and reniform). The embryo is peripheral and has its fully developed structures at the time of seed extraction of fruits that have physiological maturity. The diameters, thickness and unit weight (g/100 seeds) of the guava seed vary according to the variety, which is probably related to the number of seeds contained in each fruit. The knowledge of the concentration and exposure time of the seeds to the Tetrazolium is of paramount importance for the evaluation of the physiological quality of the seed. A concentration of 0.1% for 12 hours of exposure under temperature conditions 26 ± 2 °C and 40% relative humidity and 1% for 3 hours of exposure under controlled temperature conditions 40 °C allows unambiguous assessment of physiology quality of the seed of this species.

Keywords: Physiological Quality; *P. guajava*; Seed; Tetrazolium; Viability

Introducción

La guayaba (*Psidium guajava*) es una especie nativa de América Central que pertenece a la familia Myrtaceae y se cultiva en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales (Rojas-Garbanzo et al., 2016). Se adapta en zonas con temperatura entre 16°C y 34°C, precipitación entre 800mm y 1000 mm, y humedad relativa entre 36% y 96 %. En Colombia y Venezuela algunas variedades se cultivan hasta 1800 m.s.n.m. (García, 2010).

Castano Cano y Montes Ballesteros (2014) encontraron que las semillas de este cultivo tardan entre 2 y 3 semanas para germinar; además, presentan una testa lignificada, que posiblemente se asocia con los bajos porcentajes de germinación en condiciones naturales (Santos, Novembre, y Marcos-Filho, 2007). La latencia presente en las semillas de algunas especies limita la germinación de la misma y al mismo tiempo los programas de mejoramiento genético (Ruiz, 2018).

En la actualidad no existe información sobre la morfoanatomía de semillas de *P. guajava*, una información importante para la valoración de la viabilidad o calidad fisiológica de éstas. La prueba topográfica de Tetrazolio (Cloruro 2,3,5, Trifenil Tetrazolio) es utilizada para realizar evaluaciones rápidas sobre la viabilidad de semillas que presentan latencia profunda o de semillas no germinadas después de la prueba de germinación; de igual forma, esta prueba es utilizada para detectar daños mecánicos o daños producidos por insectos en determinados lotes de semillas. Para esta prueba es necesario que las semillas sean completamente cubiertas con la solución de Tetrazolio y no estén expuestas a la luz. La temperatura y el tiempo de tinción dependen de la especie evaluada (ISTA, 2016). Esta prueba ha sido utilizada con éxito en semillas de tomate (Marín-Sánchez et al., 2007), Soja (Craviotto et al., 2011), y *Pinus pinea* (Benito-Matías et al., 2004).

Durante la prueba, las semillas son expuestas en una solución incolora que se utiliza como indicador para mostrar el proceso de reducción al interior de las células vivas. En este proceso, los iones H⁺ liberados durante el proceso de respiración de los tejidos vivos son transferidos por un grupo de enzimas, especialmente deshidrogenasa, que interactúan con Tetrazolio el cual es reducido a formazán, un compuesto estable rojo no difusible (AOSA, 2010). En el presente trabajo se describen las características morfo-anatómicas y se desarrolla un protocolo para la valoración fisiológica (Viabilidad) de la semilla de las variedades de *P. guajava*: Palmira ICA-I, Cimpa Pulpa Roja, Manzana y Cl-0440^a, el cual no está disponible en los manuales del ISTA (2016) y AOSA (2010).

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, a 26 ± 2 °C y 40% de humedad relativa. Para la conformación morfo-anatómica de la semilla se registraron caracteres morfológicos externos como forma, color, textura y tamaño. Se midieron el diámetro polar, el diámetro ecuatorial y el grosor de la semilla de las variedades en estudio. Para estas determinaciones se tomaron tres repeticiones cada una de 50 semilla por variedad. Para calcular el Peso Unidad (PU) (gramos/100 semilla) de cada material se utilizó la metodología del octaneo. Así mismo se identificó la conformación morfo-anatómica de la semilla.

Se utilizaron semillas de *P. guajava* de la variedad Palmira ICA I, con un contenido de humedad del 10% (base húmeda). Para establecer los parámetros clave del protocolo de Tetrazolio se midieron el tipo de corte, la concentración de Tetrazolio, el tiempo de exposición y la temperatura. Para determinar la concentración de Tetrazolio y el tiempo de exposición se realizaron dos ensayos en ambientes diferentes: (1) condiciones normales de laboratorio (Temperatura 26 ± 2 °C y 40% humedad relativa), y (2) en condiciones controladas de temperatura (estufa a 40 °C) (Tabla 1).

Para la determinación de viabilidad, las semillas fueron colocadas en imbibición en agua destilada durante 12 h, antes de un corte longitudinal lateral y posterior inmersión en las diferentes concentraciones de Tetrazolio para ser colocadas en condiciones de oscuridad. Al final del tiempo de exposición a Tetrazolio, las semillas fueron retiradas y lavadas con abundante agua destilada hasta eliminar el exceso de solución. El análisis topográfico de las estructuras y su reacción a Tetrazolio se realizó con un estereoscopio provisto de una cámara fotográfica adaptada a sus lentes. En cada ensayo se valoraron nueve tratamientos mediante el uso de un diseño completo al azar con arreglo factorial (3 x 3) con tres repeticiones de 50 semilla por tratamiento para un total de 1350 semillas por ensayo.

Tabla 1 Factores evaluados en el ensayo 1 y 2, utilizando Tetrazolio como indicador de Viabilidad en Condiciones normales de laboratorio (Temperatura 26±2°C y 40% Humedad Relativa) y condiciones controladas de temperatura (estufa 40°C)

Factor	Descriptor	Niveles	Descripción
1	Concentraciones de Tetrazolio.	3	0,1% ,0,5% y 1%
2	Tiempo de exposición	3	4, 8 y 12 horas
Condiciones controladas de temperatura (estufa 40°C)			
	Descriptor	Niveles	Descripción
1	Concentraciones de Tetrazolio.	3	0,1% ,0,5% y 1%
2	Tiempo de exposición	3	1, 2 y 3 horas

Para el análisis de los datos de características morfológicas se utilizaron estadísticas descriptivas. Los efectos de los tratamientos con Tetrazolio fueron sometidos a análisis de varianza y para determinar diferencias entre medias de tratamientos se utilizó la prueba de Duncan con un nivel de probabilidad de 5%. Los resultados fueron analizados en el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.4).

Resultados y discusión

El conocimiento de la morfo-anatomía de las semillas es de importancia para la valoración de la calidad fisiología (viabilidad) de las semillas, especialmente para aquéllas que presentan latencia fisiológica profunda, lo que dificulta la valoración de la calidad fisiológica por medio de la prueba de germinación.

Las semillas de *P. guajava* presentan una testa ligeramente lisa de color crema y formas obovada, dentada, clavada, oblonga, ovoide y reniforme (Figura 1; Tabla 2) (Sánchez-Urdaneta y Peña-Valdivia, 2011). La forma obovada fue predominante en las semillas de los cuatro materiales, siendo de 60% en la variedad Palmira ICA I, 57% en Cimpa Pulpa Roja, 53% en CI-0440A y 64% para la variedad Manzana) (Tabla 2). La forma ovoide de la semilla exhibo los porcentajes más altos en comparación con las otras categorías, pero inferiores a la forma obovada.

Las semillas de guayaba contienen un embrión de tipo periférico, radícula, hipocótilo y hojas cotiledonales, las cuales están completamente desarrollados al momento de la extracción de la semilla de frutos en madurez fisiológica (Figura 2c), por lo que se descarta la presencia de latencia morfológica en semillas de la especie.

Las semillas de la variedad CI-0440A presentaron el mayor diámetro polar y ecuatorial en comparación con las otras variedades. La variedad Manzana exhibió el mayor grosor con respecto a los otros materiales (Tabla 3). Estos datos muestran que el tamaño de las semillas

de *P. guajava*, varía de acuerdo con la variedad y concuerdan con los encontrados por Meza y Bautista (2007).

El Peso Unidad (PU) (g/100 semillas) fue mayor para la variedad CI-0440A (1.28 ± 0.05) y el menor (1.04 ± 0.05) para la variedad Palmira ICA, lo que está relacionado con las diferencias en tamaños de las semillas de las variedades (Tabla 3); como lo muestra el hecho que los frutos de la variedad CI-0440A contiene menor número de semillas con respecto a los demás materiales.

Protocolo de viabilidad en semilla de *Psidium guajava*

Los protocolos para estimar la viabilidad de las semillas comprenden la determinación del tipo de corte, la temperatura en la que se realiza la prueba, la concentración de la solución con sal

Tabla 2. Forma de las semillas de cuatro variedades de Guayaba (*Psidium guajava*)

Varietades	Clases	Categoría	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Palmira ICA I	1	obovada	90	0,60
	2	dentada	7	0,05
	3	clavada	19	0,13
	4	oblonga	10	0,07
	5	ovoide	20	0,13
	6	reniforme	4	0,03
Cimpa Pulpa Roja	1	obovada	85	0,57
	2	dentada	9	0,06
	3	clavada	14	0,09
	4	oblonga	14	0,09
	5	ovoide	20	0,13
	6	reniforme	8	0,05
CI-0440A	1	obovada	80	0,53
	2	dentada	14	0,09
	3	clavada	18	0,12
	4	oblonga	12	0,08
	5	ovoide	24	0,16
	6	reniforme	2	0,01
Manzana	1	obovada	96	0,64
	2	dentada	16	0,11
	3	clavada	6	0,04
	4	oblonga	4	0,03
	5	ovoide	26	0,17
	6	reniforme	2	0,01



Figura 1. Formas de las semillas de las cuatro variedades de guayaba. A. obovada, B dentada, C clavada, D oblonga E. Ovoide F. Reniforme

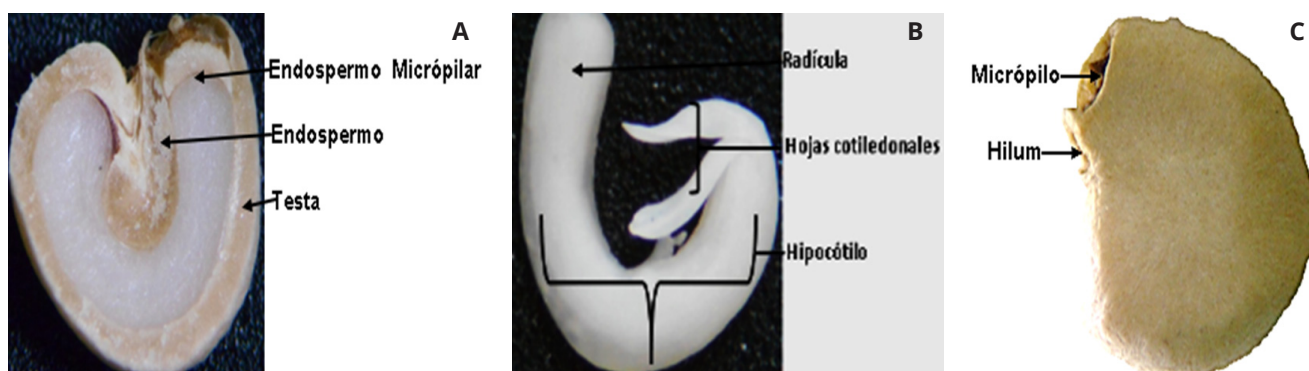


Figura 2. Descripción Anatómica de las semillas de *Psidium guajava*. A. Componentes internos de la semilla; B. Componentes externos de la semilla C. Partes esenciales del embrión

Tabla 3. Características morfológicas y peso de las semillas de cuatro variedades de Guayaba (*Psidium guajava*)

Variables	Palmira ICA I			Cimpa Pulpa Roja			CI-0440 ^a			Manzana		
	n=150									X	σ	CV
	X	σ	CV	X	σ	CV	X	σ	CV			
Diámetro polar (mm)	3,46	0,13	3,67	3,36	0,04	1,25	3,60	0,12	3,46	3,31	0,11	3,18
Diámetro ecuatorial (mm)	2,62	0,06	2,47	2,57	0,08	3,06	3,01	0,11	3,79	2,69	0,13	4,95
Grosor de semilla (mm)	1,55	0,07	4,63	1,49	0,06	4,19	1,71	0,09	5,20	1,99	0,04	1,78
Peso unidad (gramos/100 semillas)	1,04	0,05	4,51	1,11	0,03	2,28	1,28	0,05	3,89	1,06	0,03	2,4

n: número de semilla; x: media; σ Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

de Tetrazolio (Tz) y el tiempo de exposición que permita una valoración inequívoca de la viabilidad con base en la interpretación de la reacción del Tz en las estructuras esenciales de la semilla.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la concentración de Tetrazolio y el tiempo de exposición en condiciones de laboratorio (Temperatura 26 ± 2 °C y 40% de humedad relativa) y en condiciones controladas de temperatura en estufa (40°C).

Discusión

Los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio no presentaron diferencias significativas, mientras que en condiciones controladas de temperatura (estufa 40°C) indican que el tiempo mínimo de exposición de 1 h con la solución de 0.1% es suficiente para obtener interpretaciones topográficas razonables con el fin de estimar la viabilidad de la semilla (93%); resultados igualmente aceptables se obtuvieron con un tiempo de exposición de 3 h y una solución al 1% (Tabla 4). Una concentración de 0,1% durante 1 hora en condiciones controladas de temperatura (estufa 40°C) (Tabla 4), podrían proporcionar datos no confiables al momento de determinar la viabilidad de las semillas de esta especie.

En condiciones de laboratorio (T 26 ± 2 °C) el tiempo de exposición, 8 horas con la solución del 0.1% fue suficiente para lograr interpretaciones topográficas razonables para estimar la viabilidad

Tabla 4. Resultados de viabilidad (Tetrazolio) obtenidos en condiciones de laboratorio (Temperatura 26 ± 2 °C y 40% Humedad Relativa) y bajo condiciones controladas de temperatura 40°C.

Tratamiento	Condiciones de laboratorio (T 26 ± 2 °C)		
	Concentración de Tz (%)	Tiempo de Exposición (h)	Viabilidad (%)
T1	0,10	4,00	94,00 ^A
T2	0,10	8,00	96,67 ^A
T3	0,10	12,00	98,00 ^A
T4	0,50	4,00	97,33 ^A
T5	0,50	8,00	97,33 ^A
T6	0,50	12,00	98,00 ^A
T7	1,00	4,00	97,33 ^A
T8	1,00	8,00	98,00 ^A
T9	1,00	12,00	98,00 ^A
Tratamiento	Condiciones controladas de temperatura (40°C)		
	Concentración de Tz (%)	Tiempo de Exposición (h)	Viabilidad (%)
T1	0,10	1,00	93,33 ^B
T2	0,10	2,00	96,00 ^A
T3	0,10	3,00	96,67 ^A
T4	0,50	1,00	96,00 ^A
T5	0,50	2,00	96,67 ^A
T6	0,50	3,00	96,67 ^A
T7	1,00	1,00	97,33 ^A
T8	1,00	2,00	97,33 ^A
T9	1,00	3,00	98,00 ^A

*Promedios con la misma letra en la misma columna no difieren significativamente al nivel de $P < 0,05$. Según la prueba de Duncan.

de la semilla. Sin embargo, cuando se utilizó 12 horas la lectura mejoró en 1.4% (96.6 y 98% respectivamente). Esta última no fue diferente con 0.5% de concentración con 12 horas de exposición (98%); de la misma manera con 1% y 8 horas de exposición (98%). Estos resultados indican que bajo condiciones de laboratorio (T $26\pm 2C$ y 40% HR) la concentración de 0.1% y 12 horas de exposición sería la más recomendable (por menos costos del Tz) pero que si se quiere reducir el tiempo a 4-8 horas se podría con incrementos de la concentración de Tetrazolio hasta 1%. Una concentración de 0.1% y 4 horas de exposición podrían proporcionar datos no confiables para la determinación de la viabilidad de las semillas evaluadas.

Los patrones topográficos asociados con la viabilidad de las semillas de *Psidium guajava*, fueron determinados con base la tinción roja, rosada y naranja de las semillas, en sus tejidos esenciales como ser radícula, hipocótilo, y hojas cotiledonales, siendo clasificadas como viables. Las semillas que no presentaban coloración >50% en uno de sus tejidos esenciales (radícula, hipocótilo y hojas cotiledonales) fueron clasificadas como no viables; y las semillas libres de coloración en los tejidos esenciales fueron clasificadas como no viables.

Los ensayos factoriales fueron soportados con las imágenes obtenidas con las diferentes concentraciones de Tetrazolio y tiempos de exposición en los dos ambientes. Los diferentes grados de tinción en el embrión, área donde se concentra la mayor actividad metabólica de la semilla, fue total para las semillas que fueron catalogadas como viables dentro de los parámetros definidos para realizar esta evaluación. Lo utilidad de la prueba también es definido por otros autores en el sentido de que las semillas viables de un lote determinado, tienen el potencial para germinar bajo condiciones ambientales favorables. La viabilidad determinada, mediante la prueba de Tetrazolio es el porcentaje o proporción de semillas viables de un lote de semillas (Sawma & Mohler, 2002). Por otra parte, Carvalho, Grzybowski, Ohlson, & Panobianco, (2014) mencionan, que esta prueba facilita resultados fiables y precisos de la viabilidad de las semillas; aunque presenta dificultades para aplicarse en semillas pequeñas (Borza, Westerman, & Liebman, 2007).

La prueba de Tetrazolio; ofrece rápida determinación de la viabilidad de 24-48 horas, lo cual es de suma importancia para la determinación de la viabilidad en semillas de especies que presentan latencia (Nogueira Soares, Elías, Gadotti, & Villela, 2016. Carvalho, Krzyzanowski, Ohlson, & Panobianco, 2013). Las semillas de *Psidium guajava* exhiben el fenómeno de latencia, lo que es un obstáculo para obtener rápidamente

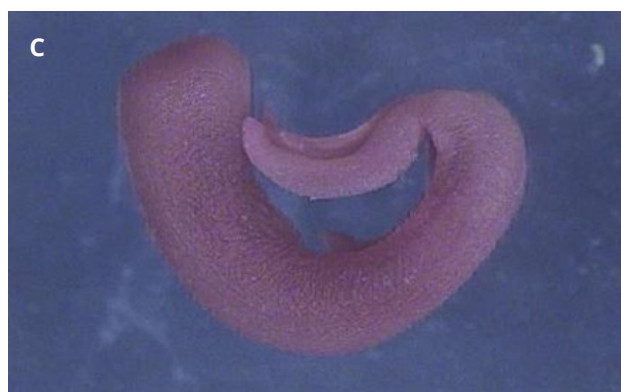
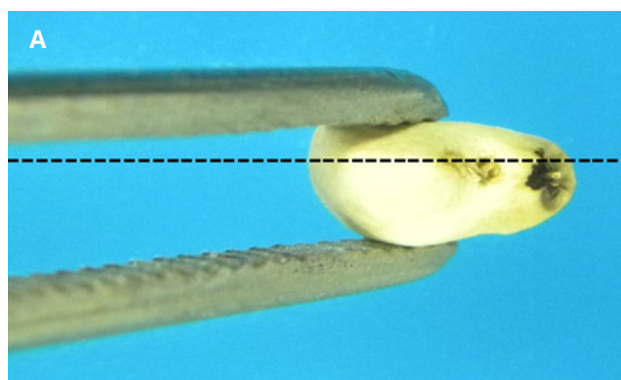


Figura 3. Procedimiento para la determinación de la viabilidad en semillas de Guayaba utilizando tetrazolio como indicador. A. Corte longitudinal lateral, B. Semillas después de la realización del corte, C. Embrión después de la exposición al Tetrazolio, D. Semillas con diferentes grados de tinción después de la exposición al Tetrazolio.

de resultados asociados a la viabilidad de las semillas mediante una prueba de germinación; es por esto, la importancia de determinar la concentración de tetrazolio y tiempo de exposición de las semillas de guayaba en las dos condiciones estudiadas.

Los protocolos que permiten evaluar la viabilidad utilizando Tetrazolio como indicador, permiten que los estudios relacionados con la condición fisiológica de las semillas avancen rápidamente, no siendo obstaculizados por la latencia que presente en la semilla. Igualmente resulta útil para los bancos de genes como el de la Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria. La correcta interpretación de las pruebas de Tetrazolio depende del conocimiento de las estructuras esenciales de la semilla, la precisión en la preparación de las semillas y la experiencia como también de la comprensión de los mecanismos de la prueba y sus limitaciones (AOSA, 2010).

Con base en todas las pruebas desarrolladas, se propone un protocolo de Tetrazolio establecido para evaluar la calidad fisiológica (viabilidad) de la semilla de guayaba (Tabla 5; Figura 3).

Tabla 5. Protocolo de Tetrazolio establecido para evaluar la calidad fisiológica (Viabilidad) de la semilla de guayaba (*Psidium guajava*). Familia: Myrtaceae; Especie: *Psidium guajava*

Pre-condicionamiento de la semilla			
Método	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	
Imbibición en agua	12	26 - 28	
Preparación de la prueba de Tetrazolio			
Método	Concentración TZ (%)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Realizar un corte longitudinal lateral, dejando intacto el eje-embriionario	0,1	12	26-28
Realizar un corte longitudinal lateral, dejando intacto el eje-embriionario	1	3	40

Conclusiones

Los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos de las semillas de *P. guajava* varían de acuerdo con la variedad. La viabilidad de las semillas de los diferentes materiales genéticos de este cultivo, puede ser determinada en condiciones normales de laboratorio (Temperatura 26±2°C y 40% Humedad Relativa) y bajo condiciones controladas de temperatura (estufa 40°C).

Referencias

- AOSA. 2010. AOSA/SCST. *Tetrazolium Testing Handbook*. Editorial Association of Official Seed Analysts Ithaca, New York, USA.32 p.
- Benito-Matías, L.; Herrero-Sierra, N.; Jiménez, I.; Peñuelas-Rubira, J. 2004. Aplicación de métodos colorimétricos Para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: test de tetrazolio e indigo carmín. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 17, 23-28. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2978417>
- Borza, J. K.; Westerman, P. R.; Liebman, M. 2007. Comparing Estimates of Seed Viability in Three Foxtail (*Setaria*) Species Using the Imbibed Seed Crush Test with and Without Additional Tetrazolium Testing. *Weed Technology*, 21(2), 518–522. <https://doi.org/10.1614/WT-06-110>
- Carvalho, T. C.; Grzybowski, C. R.; Ohlson, O. de C.; Panobianco, M. 2014. Adaptation of the tetrazolium test method for estimating the viability of sorghum seeds. *Journal of Seed Science*. 36(2), 246–252. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v32n2713>
- Carvalho, T. C.; Krzyzanowski, F. C.; Ohlson, O. D. C.; Panobianco, M. 2013. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. *Journal of Seed Science*. 35(3), 361–367. <https://doi.org/10.1590/S2317-15372013000300013>
- Castaño Cano, J. L.; Montes Ballesteros, J. C. 2014. *Estudio integral de Psidium guajava en un sistema silvopastoril en el municipio de Turbo Antioquia*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Colombia. 82 p. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/8569>
- Craviotto, R. M.; Arango-Perearnau, M. R.; Gallo, C. 2011. *Novedades de la prueba de viabilidad por Tetrazolio en soja*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 6 p. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-novedades-prueba-viabilidad-tetrazolio-en-soja.pdf>
- García, M. A. 2010. *Guía técnica del cultivo de la guayaba*. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal Enrique Álvarez Córdova. 32 p. <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA CULTIVO GUAYABA.pdf>
- ISTA-International Seed Testing Association. 2016. *International Rules for Seed Testing*. Ed. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Suiza. 46 p. https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing-_content---1--1083.html
- Marín-Sánchez, J.; Mejía-Contreras, J. A.; Hernández-Livera, A.; Peña-Lomeli, A.; Carballo-Carballo, A. 2007. Acondicionamiento osmótico de semillas de tomate de cáscara. *Agricultura Técnica en México*. 33(2), 115–123. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172007000200001
- Meza, N.; Bautista, D. 2007. Morfología de semillas de guayabo (*Psidium guajava* L.), germinación y emergencia después del remojo en agua. *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*. 24(Suppl. 1), 265–270. https://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/supl_mayo_2007/v24supl46.pdf

- Nogueira Soares, V.; Elias, S. G.; Gadotti, G. I.; Villela, F. A. 2016. Can the Tetrazolium Test be Used as an Alternative to the Germination Test in Determining Seed Viability of Grass Species? *Crop Science*, 56(2), 707-715. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.06.0399>
- Rojas-Garbanzo, C.; Zimmermann, B. F.; Schulze-Kaysers, N.; Schieber, A. 2016. Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Food Research International*. 100 (3), 445-453. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.004>
- Ruiz, C. 2018. Influencia de tratamientos pregerminativos en semillas de chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *Acta Agron*, 67(4), 531-537. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v67n4.73426>
- Sánchez-Urdaneta, A. B.; Peña-Valdivia, C. B. 2011. Descriptor morfológico para la caracterización del género *Psidium*. *Rev. Fac. Agron (LUZ)*, 28 (3), 303-343. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26886>
- Santos, M. A. O.; Novembre, A. D. L. C.; Marcos-Filho, J. 2007. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Science and Technology*, 35(1), 213-223. <https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.1.19>
- Sawma, J. T.; Mohler, C. L. 2002. Evaluating seed viability by an unimbibed seed crush test in comparison with the tetrazolium test. *Weed Technology*, 16(4), 781-786. <https://www.jstor.org/stable/3989152>



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