

Editora

**DOLLY MONTOYA CASTAÑO, Ph. D.**

Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional de Colombia

**CONSEJO EDITORIAL**

**GABRIEL OSVALDO GUTKIND, Ph.D**

Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Universidad de Buenos Aires, Argentina

**GUSTAVO BUITRAGO HURTADO, MSc**

Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional de Colombia

**ÓSCAR CASTELLANOS D., Ph. D.**

Facultad de Ingeniería  
Universidad Nacional de Colombia

**ÓSCAR ALZATE, Ph. D.**

Department of Neurobiology  
Duke University Medical Center, EE.UU.

**ENRIQUE GALINDO, Ph. D.**

Departamento de Bioingeniería  
Universidad Autónoma de México, México

**RAFAEL RANGEL ALDAO, Ph. D.**

Departamento de Tecnología y Procesos  
Biológicos y Bioquímicos  
Universidad Simón Bolívar, Venezuela

**MARÍA TERESA REGUERO R., MSc**

Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional de Colombia

**JORGE MAYER, Ph. D.**

Golden Rice Project – Manager  
University of Freiburg, Alemania

**Directora Ejecutiva**

Jaqueline Ramírez Piraján, MSc  
Universidad Nacional de Colombia

Con el apoyo de:



**COLCIENCIAS**  
C O L O M B I A

**Nombre de la Obra:**

“Biopolímeros: una alternativa amigable  
con el medio ambiente”

**Autor:**

Grupo biopolímeros y biofuncionales,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá,  
Colombia.

**Lugar:**

Universidad Nacional de Colombia,  
Sede Bogotá

**CONSEJO ASESOR**

**ANDRÉS ILLANES, MSc**

Escuela de Ingeniería Bioquímica  
Universidad Católica de Valparaíso, Chile

**ALLAN RUSSELL, Ph. D.**

McGowan Institute for Regenerative Medicine  
Universidad de Pittsburgh, EE.UU.

**JORGE OSSA, Ph. D.**

Corporación Biogénesis  
Universidad de Antioquia, Colombia

**ARCADY SINITSYN, Ph. D.**

Departamento Cinética Enzimática  
Universidad Estatal de Moscú, Rusia

**JUAN GENTINA, MSc**

Escuela de Ingeniería Bioquímica  
Universidad Católica de Valparaíso, Chile

**JOSÉ SÁNCHEZ-SERRANO, Ph. D.**

Centro Nacional de Biotecnología  
Madrid, España

**FABIO A. ARISTIZÁBAL GUTIERREZ, Ph.D.**

Instituto de Biotecnología,  
Departamento de Farmacia  
Universidad Nacional de Colombia

**JENNY DUSSAN, Ph. D.**

Centro de Investigaciones Microbiológicas  
Universidad de los Andes, Colombia

**RUBÉN TORRENEGRA, Ph. D.**

Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad  
Javeriana, Colombia

**RODRIGO LÓPEZ, Ph.D**

EMBL-EBI  
European Bioinformatics Institute, UK

**NINFA MARÍA ROSAS GARCÍA, PhD**

Centro de Biotecnología Genómica  
Instituto Politécnico Nacional, México

**CAMILO LÓPEZ, Ph.D.**

Departamento de Biología  
Universidad Nacional de Colombia

**OLIVIER THOMAS, Ph.D**

Faculté des Sciences  
University of Nice, France

**RODOLFO QUINTERO, Ph. D.**

Programa de Biotecnología del Petróleo  
Instituto Mexicano del Petróleo, México

**YOAV BASHAN, Ph. D.**

Departamento de Microbiología  
Centro de Investigaciones Biológicas del  
Noroeste, México

Esta publicación ha sido indexada en:

- Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts- Verfahrenstechnische Berichte – CEABA – VtB (Alemania)
- Sistema de Información de publicaciones científicas seriadas en América Latina, El Caribe, España y Portugal (LATINDEX)
- Índice Nacional de publicaciones seriadas, científicas y tecnológicas (PUBLINDEX)
- Red de Revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)
- Índice de revistas latinoamericanas en ciencias PERIÓDICA de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) <http://www.snsr.mx/bidimasp/periodica.html>
- Base de datos bibliográfica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) <http://dgb.unam.mx/periodica.html>
- Informe Académico. International Thomson Editores S.A. de C.V. Thomson Gale
- LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde)
- DIALNET (Universidad de la Rioja- España)
- CAB Abstracts and Global Health (Wallingford, UK)
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España)
- Swets Information Services B.V. (The Netherlands)
- INIST- Centre National de la Recherche Scientifique
- Institut de L'Information Scientifique et Technique (France)

**Coordinación Académica**



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA**  
SEDE BOGOTÁ

**Público objetivo**

Investigadores, estudiantes y profesionales  
de las disciplinas que se desarrollan  
en torno a la biotecnología.

**Periodicidad:**

semestral

**Corrección de estilo y diagramación**

Dora Álvarez S.

**Impresión**

Fundación Cultural Javeriana de Artes Gráficas  
Javegraf

La Revista Colombiana de Biotecnología no se responsabiliza por las ideas emitidas por los autores.

Los artículos que aparecen en esta revista pueden ser reproducidos citando la fuente.

## CONTENIDO

### EDITORIAL

Biopolímeros y su aplicación en medio ambiente Sonia Ospina .....	5
--	---

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Propagación <i>in vitro</i> de materiales seleccionados de <i>Rubus glaucus</i> Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia Giovanni Orlando Cancino-Escalante, Enrique Quevedo García, Carmen Edilia Villamizar, Claudia Díaz Carvajal .....	7
Mejoramiento de la germinación, control de la hiperhidricidad y formación de brotes en <i>Vasconcellea stipulata</i> Badillo Diego Paúl Vélez-Mora, Rosa Armijos González, Miguel Jordán Zimmermann .....	16
Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de "panela" con gránulos de kéfir de agua Caro Vélez, C.A, León Peláez, A.M .....	22
Caracterización bioquímica de hojas de clones de <i>Theobroma cacao</i> y su relación con los tricomas Janet Quiñones-Galvez, Daynet Sosa, JR. Demey, Silvia Alemán, Maryla Sosa, Dercy Parra, Olga Móvil, Reinaldo Trujillo, Yanelis Capdesuñer, Yemey Quirós, Martha Hernández, Diógenes Infante .....	33
Producción de polisacáridos a partir de <i>Ganoderma</i> sp., aislado en la región andina Xiomara López Legarda, Carolina Arboleda Echavarría, Freimar Segura Sánchez .....	44
Remoción anaerobia del colorante azul directo brl en Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) con carbón activado Christian Zavala-Rivera; Alex Dueñas-Gonzá; Ronald Huarachi-Olivera, Ursulo Yapo-Pari; Rodrigo Mendoza-Puertas; Ronny Lázaro-Puma; Edwin Bocardo-Delgado .....	55
Embriogénesis somática en el cultivar de plátano 'FHIA - 25' (AAB) a partir de ápices meristemáticos Dayana Rodríguez González, Jorge López Torres, Aymé Rayas, Nery Montano Pérez, Arletys Santos Pino, Milagros Basail Pérez, Damicela Reynaldo Alvarez, Yoel Beovides García, Víctor Medero Vega .....	65
Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de <i>Aspidosperma polyneuron</i> García Lozano Diana Lorena, Mesa López Neftalí, Ocampo Guerrero Martha Lily .....	76
Efecto de Dicamba y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis somática en caña de azúcar Beatriz Alvez, Maira Oropeza .....	85
Prototipo de formulación y atmósfera de empaque para la cepa antagonista <i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps006 Carolina Ruiz, Martha Gómez, Laura Villamizar .....	95

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia: una consulta a expertos Diana Corina Zambrano, Ruth Rebeca Bonilla, Laura Avellaneda, Gregorio Zambrano .....	103
--	-----

### ARTÍCULOS CORTOS

Efecto del anegamiento en la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en raíces de maracuyá amarillo <i>Passiflora Edulis</i> var. <i>Flavicarpa</i> Keren Natalia Giraldo Cervantes, Elisabet Ampudia Mesias, Enrique Bravo, Montaña, Jaime Restrepo Osorio .....	114
Estandarización de un protocolo para <i>Northern blot</i> no radioactivo usado en la detección de pequeños RNA en células Vero Natalia Campillo-Pedroza, Juan Pablo Franco Salazar, Juan Carlos Gallego- Gómez .....	123

Valoración de impacto ambiental en el Puerto Moa-Holguín <i>Guilarte, A.; Díaz, A.; Nápoles J.; Fernández, O.; Abalos, A.; Pérez, R.M.</i> .....	129
Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Bacillus</i> spp. con actividad contra <i>Tetranychus urticae</i> Koch en cultivos comerciales de rosas <i>Isabel Larrea Izurieta, Carlos Falconí Borja, Andrea Arcos Andrade</i> .....	140
<b>BIONOTAS</b>	
Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar <i>Marcia M. Rojas, Anar J. Rodríguez, Lester González, Mayra Heydrich</i> .....	149
Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Hypericum goyanesii</i> Cuatrec. E <i>Hypericum juniperinum</i> Kunth, a partir del cultivo de semillas <i>Belkys Adriana Pérez-Martínez</i> .....	156
<b>INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES</b> .....	164

## CONTENTS

### EDITORIAL

Biopolymers and its application on environment <i>Sonia Ospina</i> .....	5
---	---

### RESEARCH ARTICLES

Propagation <i>in vitro</i> of selected materials of <i>Rubus glaucus</i> Benth (mora de Castilla) in the province of Pamplona, northeastern Colombia <i>Giovanni Orlando Cancino-Escalante, Enrique Quevedo García, Carmen Edilia Villamizar, Claudia Díaz Carvajal</i> .....	7
Enhancement of germination, hyperhydricity control and <i>in vitro</i> shoot formation of <i>Vasconcellea stipulata</i> Badillo <i>Diego Paul Vélez-Mora, Rosa Armijos González, Miguel Jordán Zimmermann</i> .....	16
Antifungal capacity of cell-free supernatants obtained from fermentation of a substrate of brown sugar with water kefir grains <i>Caro Vélez, C.A, León Peláez, A.M</i> .....	22
Biochemical characterization of leaves in <i>Theobroma cacao</i> clones and its relation with trichomes <i>Janet Quiñones-Galvez, Daynet Sosa, JR. Demey, Silvia Alemán, Maryla Sosa, Dercy Parra, Olga Móvil, Reinaldo Trujillo, Yanelis Capdesuñer, Yemeys Quirós, Martha Hernández, Diógenes Infante</i> .....	33
Polysaccharides production by <i>Ganoderma</i> sp., isolated from andina region <i>Xiomara López Legarda, Carolina Arboleda Echavarría, Freimar Segura Sánchez</i> .....	44
Anaerobic removal of the brl direct blue dye in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) with activated carbon <i>Christian Zavala-Rivera; Alex Dueñas-Gonza; Ronald Huarachi-Olivera, Ursulo Yapo-Pari; Rodrigo Mendoza-Puertas; Ronny Lázaro-Puma; Edwin Bocardo-Delgado</i> .....	55
Somatic embryogenesis in plantain cultivar 'FHIA - 25' (AAB) from meristem tips <i>Dayana Rodríguez González, Jorge López Torres, Aymé Rayas, Nery Montano Pérez, Arletys Santos Pino, Milagros Basail Pérez, Damicela Reynaldo Alvarez, Yoel Beovides García, Víctor Medero Vega</i> .....	65
Standardization of the disinfection protocol for the micropropagation of <i>Aspidosperma polyneuron</i> <i>García Lozano Diana Lorena, Mesa López Neftalí, Ocampo Guerrero Martha Lily</i> .....	76
Effect of Dicamba and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on sugarcane somatic embryogenesis <i>Beatriz Alvez, Maira Oropeza</i> .....	85
Formulation prototype and atmosphere packaging for the antagonistic strain <i>Pseudomonas fluorescens</i> PS006. <i>Carolina Ruiz, Martha Gómez, Laura Villamizar</i> .....	95

## REVIEW ARTICLE

- Prospective analysis of agricultural bioinoculants in Colombia: an expert consultation  
*Diana Corina Zambrano, Ruth Rebeca Bonilla, Laura Avellaneda, Gregorio Zambrano* . . . . . 103

## SHORT ARTICLES

- Effect of waterlogging on the alcohol dehydrogenase activity in yellow passion fruit roots  
*Passiflora Edulis* var. *Flavicarpa*  
*Keren Natalia Giraldo Cervantes, Elisabet Ampudia Mesias, Enrique Bravo, Montaño, Jaime Restrepo Osorio* . . . . . 114
- Standardization of Northern blot non-radioactive protocol used in the detection of small RNAs in Vero line cells  
*Natalia Campillo-Pedroza, Juan Pablo Franco Salazar, Juan Carlos Gallego-Gómez* . . . . . 123
- Environmental impact assessment in Moa-Holguín Port  
*Guilarte, A.; Díaz, A.; Nápoles J.; Fernández, O.; Abalos, A.; Pérez, R.M.* . . . . . 129
- Isolation and characterization of strains of *Bacillus* spp. With activity against *Tetranychus urticae* Koch in commercial crops of roses  
*Isabel Larrea Izurieta, Carlos Falconí Borja, Andrea Arcos Andrade* . . . . . 140

## BIONOTES

- Influence of different factors in the growth of endophytic bacteria of sugarcane  
*Marcia M. Rojas, Anar J. Rodríguez, Lester González, Mayra Heydrich* . . . . . 149
- Establishing *in vitro* *Hypericum goyanesii* Cuatrec. E *Hypericum juniperinum* Kunth, from seeds culture  
*Belkys Adriana Pérez-Martínez* . . . . . 156

- AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE  
REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA . . . . . 166

# Biopolímeros y su aplicación en medio ambiente

## Biopolymers and its application on environment

Sonia Ospina\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54295

El uso de empaques desechables ha hecho que en el mundo se generen millones de toneladas de desechos no biodegradables. Durante muchos años utilizamos empaques plásticos no degradables, derivados del petróleo. Tardíamente nos hemos dado cuenta que de continuar con este ritmo de contaminación, muy pronto ocasionaremos daños irreparables al medio ambiente. Es por ello, que todos los esfuerzos en torno a buscar alternativas al uso de empaques no biodegradables, son de gran importancia, con el fin de recuperar el medio ambiente dañado hasta ahora, así como prevenir el deterioro en adelante. En este sentido, la investigación en distintas áreas de la biotecnología ha permitido la obtención de empaques biodegradables producidos a partir de biopolímeros microbianos.

Los biopolímeros por su biodegradabilidad, procesos de manufactura ecoamigables y su vasto rango de aplicación, son alternativas importantes a productos no sustentables y pueden ser producidos a través de biorefinerías como parte de bioprocesos integrados (1). El desarrollo de los procesos fermentativos, junto con la obtención de microorganismos recombinantes sobre-productores de este tipo de compuestos, así como los adelantos en procesos de purificación, han permitido llevar a nivel industrial diferentes procesos para la obtención de biopolímeros.

Unos de estos compuestos son los polihidroxialcanoatos (PHAs) (2), que han sido uno de los polímeros biodegradables más estudiados, por sus buenas características para la producción de empaques. Estos son biopolímeros intracelulares, producidos como cuerpos de inclusión en microorganismos del género *Pseudomonas* y *Azotobacter* entre otros. Son compuestos termoplásticos, compatibles y completamente biodegradables, enantioméricamente puros, no tóxicos, insolubles en agua, inertes, estables al aire y presentan buena procesabilidad en equipo. Tienen además potencial uso en ortopedia, en sistemas de entrega cardiovascular, así como en producción de microesferas para sistemas de entrega de fármacos. Sin embargo, aún se deben mejorar los procesos de producción para obtener productos competitivos en el mercado (3).

Otros biopolímeros muy estudiados son los exopolisacáridos (EPS: sustancias poliméricas extracelulares). Son compuestos excretados por algunos microorganismos como *Pseudomonas*, *Lactococcus* y *Bacillus*, que participan en adhesión de los microorganismos a superficie, formación de matriz, control de fisiología microbiana y estabilidad de lodos (4).

Una aplicación interesante del uso de EPS en la bioremediación del medio ambiente consiste en su adición al suelo con el objeto de controlar la desertificación del mismo. Su aplicación tiene un efecto potencial en reducir la erosión del suelo, por incremento en la cohesión interparticular, así como en el mejoramiento de la germinación de la vegetación y características de retención de agua del suelo contra la evaporación (4). Así mismo se han empleado EPS para incrementar la fijación de nitrógeno en los suelos, y estudios recientes han demostrado que la adición de coproductos de biodiesel, un complejo orgánico formado durante la transesterificación de lípidos (BCP) incrementa la transferencia de EPS en el suelo, mejorando la fijación de nitrógeno en el mismo (5).

Otra aplicación reciente de los biopolímeros consiste en la producción de empaques biodegradables con atmósfera modificada producidos a partir de ácido poliláctico, los cuales presentan permeabilidad a

\* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. saospinas@unal.edu.co

gases, permitiendo un aumento de tiempo de vida útil de frutas y verduras frescas, manteniendo las características de frescura, color y aromas (6).

Otra fuente importante de contaminación de la sociedad moderna consiste en el uso de aceites con diferentes aplicaciones, los cuales finalmente terminan contaminando el agua municipal de las diferentes ciudades (7). Estos aceites tienen origen tan diverso como su uso alimenticio, en productos de protección de la piel, lubricantes y combustibles. Estos pueden formar emulsiones al entrar en contacto con el agua, lo cual se favorece por la alta concentración de surfactantes presentes en diferente tipo de productos; esto los hace más difíciles de separar, incrementando el nivel de contaminación del agua, ya que se trata de productos no degradables. Además muchos de los aditivos empleados en la producción de productos procesados tales como los mismos emulsificantes, surfactantes, agentes inhibidores de la corrosión y biocidas, pierden sus propiedades lubricantes y generan desechos tóxicos. Es por ello que se han propuesto diferentes métodos para remover este tipo de compuestos, los cuales incluyen adsorción, floculación, electro-floculación y electro-flotación. Uno de estos métodos, la adsorción, ha empleado en su proceso algunos biopolímeros de producción local, lo que los hace métodos baratos de descontaminación del agua, para separar el aceite. Dentro de estos compuestos se encuentra la quitina, ( $\alpha$ -1-4 2- acetamido 2-deoxy  $\delta$ -glucano), componente de la cutícula de crustáceos, insectos y moluscos, así como en la pared celular de hongos. Estos compuestos se han estudiado con el objeto de eliminar el aceite de las dispersiones acuosas.

Los biopolímeros también han sido empleados por su actividad floculante, se trata de biopolímeros extracelulares tipo proteína, carbohidratos y lípidos, obtenidos de diversos géneros microbianos, los cuales se emplean entre otros, en el tratamiento de aguas, dragado, textiles y minería. Su característica de biodegradabilidad le otorgan ventajas sobre otro tipo de agentes floculantes. Son obtenidos a partir de diversos géneros microbianos (8).

Una aplicación de los biopolímeros recientemente implementada es el uso de gomas naturales para la eliminación de uranio de los efluentes de esta industria. La capacidad de la goma de atrapar metales tóxicos es muy importante, en un ambiente cada día más contaminado por este tipo de compuestos (9).

Como se aprecia, el rango de aplicaciones de los biopolímeros es muy amplio, dada sus características de biodegradabilidad y posibilidad de uso en diversos procesos. Por esta razón es importante el estudio y obtención de este tipo de compuestos y en este sentido vemos cada día el desarrollo de nuevos productos y nuevas aplicaciones de estos compuestos.

## Referencias

- (1) Sukan, A., Roy, I., & Keshavarz, T. (2015). Dual production of biopolymers from bacteria. *Carbohydrate polymers*, 126, 47-51.
- (2) Moreno, N., Gutiérrez, I., Malagón, D., Grosso, V., Revelo, D., Suárez, D.,C, González, J, Aristizábal, F, Espinosa, A. & Montoya, D. (2007). Bioprospecting and characterization of poly-bhydroxyalkanoate (PHAs) producing bacteria isolated from Colombian sugarcane producing areas. *African Journal of Biotechnology*, 6(13), 1536-1543.
- (3) Leong, Y, Show, P, Ooi Ch, Ling, T, Lan, J. (2014). Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 180, 52-56
- (4) Chang, I, Prasadhi, A, Im, J, Shin, H and Cho, G. (2015). Soil treatment using microbial biopolymers for anti-desertification purposes. *Geoderma*, 253, 39-47.
- (5) Redmile-Gordon, M, Evershed, R, Kuhl, A, Armenise, E, White, R, Hirsch, P, Goulding, K and Brookes, P. (2015). Engineering soil organic matter quality: Biodiesel Co-Product (BCP) stimulates exudation of nitrogenous microbial biopolymers. *Geoderma*, 259-260, 205-212.
- (6) Mistriotis, a, Briassoulis, D, Giannoulis, A and D´Aquino S. (2016). Designs of biodegradable bio-based equilibrium modified atmosphere packaging (EMAP) for fresh fruits and vegetables by using micro-perforated poly-lactic (PLA) films. *Postharvest Biology and technology*, 111, 380-389.
- (7) Elanchezhian, S, Sivasurian, N and Sankaran Meenakshi. (2014). Recovery of oil from oil-in-water emulsion using biopolymers by absorptive method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 399-407.
- (8) Salehizadeh, H and Yana, N. (2014). Recent advances in extracellular biopolymer flocculants. *Biotechnology Advances*, 32, 8, 1506-1522.
- (9) Sashidhar, R, Kalaighana Selvi, S, Vinod, V, Kosuri, T, Raju, D and Karuna, R. (2015). Bioprospecting of gum kondagogu *Cochlospermum gossypium* for bioremediation of uranium (VI) from aqueous solution and synthetic nuclear power reactor effluents. *Journal of Environmental Radioactivity*, 148, 33-41.



# Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia

## Propagation *in vitro* of selected materials of *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) in the province of Pamplona, northeastern Colombia

Giovanni Orlando Cancino-Escalante\*, Enrique Quevedo García\*\*, Carmen Edilia Villamizar\*\*\*, Claudia Díaz Carvajal\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262

### Resumen

En este estudio los materiales fueron seleccionados en 53 fincas pertenecientes a cuatro asociaciones de cultivadores de mora en los municipios de Pamplona y Chitagá (Norte de Santander, Colombia). Se emplearon como explantes segmentos nodales, los cuales permitieron obtener en poco tiempo brotes adventicios adecuados para la multiplicación masiva. Para la etapa de establecimiento se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog, (MS 1962), suplementado con ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0.0-0.1 mg/L) y 6-benzil aminopurina (BAP) (0.0-2.0 mg/L), en la etapa de multiplicación MS, suplementado con GA<sub>3</sub> (0.0-0.03 mg/L) y BAP (0.0-2.5 mg/L) y para la etapa de enraizamiento MS, suplementados con ácido indolbutírico (AIB) (0.0-1.0 mg/L). A los datos generados en las tres etapas, se les aplicó un diseño experimental de bloques completos al azar y se analizaron estadísticamente los promedios de los tratamientos mediante una prueba de Tukey. Los resultados alcanzados indicaron tasas promedio de contaminación (16,5-49,7 %) multiplicación (3,8-4,3 brotes/explante) y enraizamiento (3,3-4,3 raíces/planta) *in vitro* para los diferentes materiales seleccionados y evaluados. Estos resultados, logrados por primera vez en la región Nororiental de Colombia, son importantes por cuanto se contara con materiales seleccionados disponibles para los cultivadores de mora de la región.

**Palabras clave:** Mora de los Andes, micropropagación, asociaciones de cultivadores, 6-benzil aminopurina.

### Abstract

In this study plant materials were selected in 53 farms belonging to four growers associations of blackberry in the municipalities of Pamplona and Chitagá (North of de Santander, Colombia). Nodal segments were used as initial explants of *R. glaucus*. For the establishment stage Murashige and Skoog, 1962 (MS) media was used and, supplemented with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.0 -0.1 mg/L) and 6-aminopurine (BAP) (0.0 -2.0 mg/L); for the multiplication stage MS was supplemented with GA<sub>3</sub> (0.0 -0.03 mg/L) and BAP, (0.0 -2.5 mg/L) and for the rooting stage MS was supplemented with acid indolbutirico (0.0 -1.0 mg/L). From the data generated during the three stages, an experimental design of incomplete blocks was randomly applied and the treatments averages were statistically analyzed using the Tukey Test. The results indicated average rates of contamination (16.5-49.7 %), multiplication (3.8-4.3 shoots/explant) and *in vitro* rooting (3.3-4.3 roots/plant) for the different evaluated materials. These results, achieved first in the Northeastern region of Colombia, are important in that they will feature selected materials available for blackberry growers in the region.

**Key words:** Andean blackberry, micropropagation, growers associations, 6-aminopurine.

**Recibido:** octubre 15 de 2014

**Aprobado:** septiembre 2 de 2015

- \* Profesor Asociado PhD. Universidad de Pamplona - Facultad de ciencias básicas – Departamento de Biología. Km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. gcancino@unipamplona.edu.co
- \*\* Profesor Asociado MSc. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Agrarias - Departamento de Agronomía. km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. enriquegarcia@unipamplona.edu.co
- \*\*\* Profesor MSc. Universidad de Pamplona, Facultad de Educación. km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. cevill28@gmail.com.
- \*\*\*\* MSc Universidad de Pamplona - Facultad de ciencias básicas – Departamento de Biología. Km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. gcancino@unipamplona.edu.co

## Introducción

El género *Rubus* es uno de los más diversos en términos morfológicos y genéticos. Presenta un amplio espectro de especies silvestres y las cultivadas son apetecidas por sus frutos comestibles (Jennings, 1988). Los frutos son consumidos frescos o procesados y actualmente existe gran interés por sus propiedades medicinales debido a su alta actividad antioxidante (Seeram et al., 2006, Cusba Mejía 2011).

La especie de *Rubus* que actualmente se cultiva comercialmente de manera masiva en Suramérica es *R. glaucus* Benth. Esta especie se distribuye ampliamente en el país, desde el departamento del Putumayo hasta el Valle del Magdalena y se cultiva en altitudes entre 2 000 y 3 200 m s.n.m. Según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Departamento Administrativo de Estadística (DANE) para noviembre de 2013, Colombia contaba con 7 007 hectáreas plantadas, de las cuales 4 922 están en edad productiva y una producción de 73 856 toneladas anuales. Adicionalmente los departamentos de Cundinamarca, Santander, Norte de Santander y Antioquia, son los que presentan los mayores porcentajes en área y producción (DANE, 2013).

A pesar del gran potencial de la mora en el mercado internacional, su propagación se hace vegetativamente en Colombia a partir de materiales no identificados como élite; productores y viveros propagan los materiales regionales sin normas de calidad fisiológica y sanitaria ni ofrecen seguridad de la identidad genética del material (Castro & Díaz, 2001; Castro, Díaz, Montoya & Ríos, 2006).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* o micropropagación se constituye en una herramienta práctica que permite superar estas limitaciones. Adicionalmente, es una técnica rápida en especies frutales y puede producir masivamente individuos de *Rubus* genéticamente idénticos y libres de virus en un espacio reducido, sin ser afectados por las variaciones ambientales (Zimmerman, 1991; Sobczykiewicz, 1992).

A nivel mundial se han publicado varios trabajos de cultivo *in vitro* de diferentes especies de *Rubus*. El primer trabajo de propagación *in vitro* de *Rubus* fue desarrollado por Broome y Zimmerman (1978) en los cultivares *thornless* y *harper* de mora. Posteriormente las investigaciones se han centrado en los factores que influyen en la respuesta *in vitro* como son la desinfección de los explantes y las bajas tasas de propagación (McPheeters, Skirvin & Hall 1988; Tian, Duan & Wang, 2005; Wu, Miller, Hall & Mooney, 2009, Clark & Finn, 2011). Igualmente se destacan experimentos que se focalizan en la micropropagación de nuevos cultivares y en los existentes (Donnelly & Daubeney 1986; Bobrowski, Mello Farias & Peters, 1996; González et al., 2000; Zawadzka & Orlikowska, 2006). En Colombia, Marulanda y Márquez (2002), obtuvieron plantas mediante organogénesis, procedentes de la zona cafetera

colombiana; Castro y Díaz (2001) por su parte han desarrollado metodologías para la micropropagación de mora de material seleccionado. Adicionalmente, Valderrama et al., 2009 publicaron la validación y escalonamiento de plántulas de mora *in vitro* y manejo *ex vitro* para entrega a agricultores de Silvanía, Cundinamarca. Igualmente se destaca las investigaciones de Sigarro y García (2011), quienes evaluaron la micropropagación en *R. glaucus* sin espinas. Sin embargo a pesar de las diferentes investigaciones a través de los años un gran número de cultivares son todavía recalcitrantes al cultivo de tejidos. Entre los factores críticos que influyen en la respuesta *in vitro* se encuentran la desinfección del explante y la baja tasa de propagación (Daubeney, 1986, MCPheeters et al., 1988; Donnelly y Daubeney, 1986 y Bobrowski et al., 1996; González, López, Valdés y Ordas, 2000; Tian et al., 2005, Zawadzka y Orlikowska, 2006, Clark y Finn, 2011).

En consecuencia el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la micropropagación de materiales seleccionados de *R. glaucus* de ocho fincas comerciales en los municipios de Pamplona y Chitagá los cuales habían sido caracterizados tanto agrónomicamente como molecularmente (Cancino, Quevedo, Villamizar, Sánchez y Díaz, 2014).

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Entre marzo de 2009 y noviembre de 2011 se efectuaron salidas de campo para la recolección de muestras *R. glaucus* en 53 fincas de cuatro asociaciones de cultivadores de mora de los municipios de Pamplona y Chitagá. De acuerdo con los resultados de encuestas a agricultores y características agronómicas, se seleccionaron 8 fincas en las cuales se encontraban los mejores materiales de las cuatro asociaciones (figura 1, tabla 2). Para la evaluación de micropropagación se seleccionó un material por finca para un total de ocho materiales. Previamente estos materiales habían sido caracterizados agrónomicamente y molecularmente (Cancino et al., 2011, 2014). Las fincas se localizan en 14 veredas de los municipios de Pamplona y Chitagá, entre 7°7',60" y 7°28',15" norte y 72°35',16" y 72°42',43" Oeste (figura 1). Todas las fincas poseen cultivos comerciales de *R. glaucus*, mora de Castilla con espinas (CE) y sin espinas (SE) rodeados de bosques secundarios y matorrales a altitudes entre los 2 070 y 2 860 m s.n.m.

### Establecimiento *in vitro*

Para el establecimiento *in vitro* de explantes del material seleccionado en las diferentes fincas se efectuaron nuevamente salidas de campo en cada uno de los predios. Se recolectaron segmentos de tallo de ramas jóvenes de 50 cm de longitud y se llevaron en vueltas

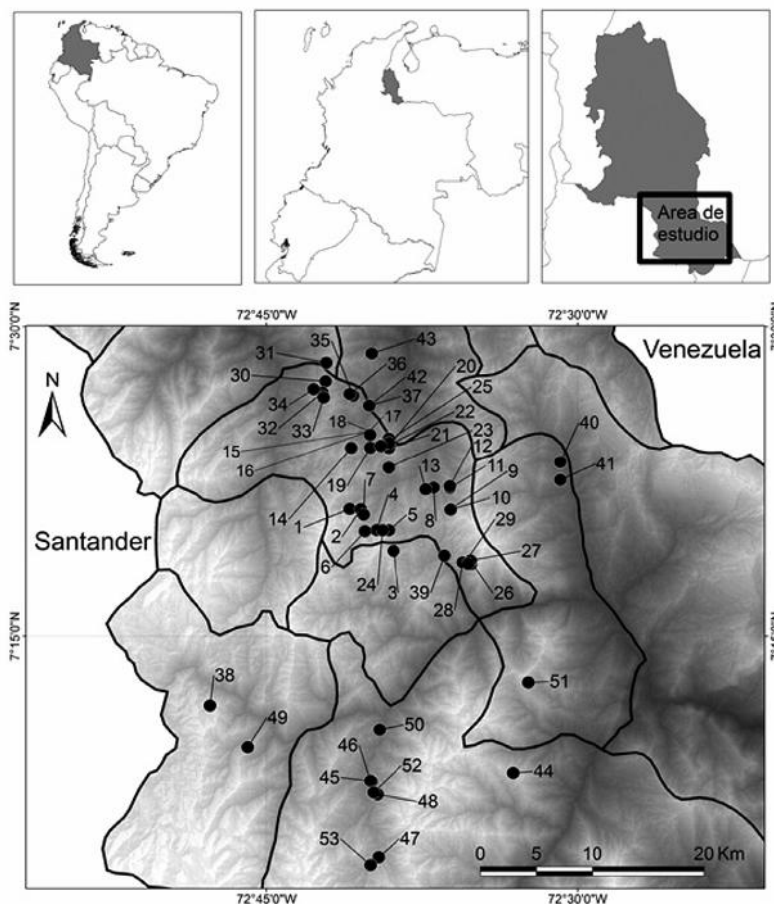


en papel periódico, al laboratorio de cultivos vegetales *in vitro* de la Universidad de Pamplona. Las ramas fueron cortadas hasta obtener segmentos nodales (microestacas) de 3-5 cm de longitud aproximadamente con una yema axilar; los explantes fueron lavados en una solución jabonosa; posteriormente, se sometieron a dos tratamientos de desinfección superficial (tabla 1). Finalizados los tiempos de desinfección superficial, se efectuaron 5 enjuagues en los explantes, con agua destilada estéril y se colocaron en una solución de ácido cítrico 150 mg/L para controlar la oxidación, mientras se procedía a su siembra. Los explantes desinfectados se cortaron nuevamente hasta obtener un explante (microestaca con yema axilar) de 2 cm de longitud. Cada explante, fue colocado en el medio de establecimiento MS suplementado, con concentraciones de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y 6-benzil aminopurina (BAP). Al cabo de una semana se tomaron los ápices meristemáticos que emergieron de cada microestaca libres de cualquier contaminación y se transfirieron a medio fresco con el fin de garantizar un rápido establecimiento de los explantes y 30% de sacarosa. Los medios con un pH ajustado de 5,8 se esterilizaron con autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y

121°C. Para la solidificación de los medios se utilizó agar bacteriológico al 7%. Posteriormente, al cabo de 20 días de incubación a una temperatura de 20±2°C, fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 2000 lux, se descartaron los explantes contaminados y dejaron por 20 días más los explantes sin contaminación. El establecimiento de los explantes se realizó bajo condiciones de estricta asepsia utilizando para ello una cámara de flujo laminar previamente acondicionada. Los explantes fueron establecidos en frascos de compota con 20 ml de medio de cultivo semisólido.

**Tabla 1.** Tratamientos de desinfección superficial evaluados

Componente	T1	T2
	Minutos (m)	Segundos (S)
Isodine® espuma 2%.	10 m	10 m
Fungicida Mertec® 0,4%	30 m	60 m
Alcohol 70%	30 s	60 s



**Figura 1.** Área de estudio. Municipios de Pamplona y Chitagá, Norte de Santander, Colombia. Ubicación de las fincas (53) donde se recolectaron las muestras de *R. glaucus* Benth.

**Tabla 2.** Materiales seleccionados de las ocho fincas de este estudio en el municipio de Pamplona.

Número	Código	Finca	Vereda	m s.n.m <sup>3</sup>
1	PCHA03 SE <sup>1</sup>	Arrayan	Chíchira	2.328
2	PRH305 SE	Higuerón	El Rosal	2.745
3	PCV3016 SE	La Victoria	Cimitarigua	2.585
4	PSS SE	Salado	San Francisco	2.293
5	PSAG002 CE <sup>2</sup>	La Gonzalera	Sabaneta alta	2.585
6	PSAG010CE	La Gonzalera	Sabaneta alta	2.585
7	PSAG011CE	La Gonzalera	Sabaneta alta	2 585
8	PCV102CE	La Victoria	Cimitarigua	2.585

<sup>1</sup> S.E. *R. glaucus* Benth sin espinas <sup>2</sup> C.E. *R. glaucus* Benth con espinas. <sup>3</sup> m s.n.m metros sobre el nivel del mar.

Hipoclorito sodio 2%	10 m	
Hipoclorito sodio 3%		10 m

### **Multiplicación in vitro**

Los explantes sanos y libres de contaminantes se dividieron y se transfirieron al medio de multiplicación MS, suplementados con concentraciones de (GA<sub>3</sub>) y (BAP), (tabla 3, medios M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>5</sub> y M<sub>6</sub>) y 30% de sacarosa. Luego de cuatro semanas de crecimiento se dividieron los explantes nuevos y se transfirieron a un medio fresco de multiplicación hasta obtener el número de explantes para cada genotipo evaluado.

### **Enraizamiento in vitro**

Los explantes multiplicados se dividieron, se sembraron en el medio de enraizamiento MS suplementados con ácido indolbutírico (tabla 3, medios M<sub>8</sub> y M<sub>9</sub>) y 30% de sacarosa. Los explantes se incubaron durante cuatro semanas a las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica establecidas en la etapa de establecimiento y multiplicación.

### **Diseño experimental y análisis de datos**

Se realizó un diseño de bloques completos al azar, con arreglo factorial 9 x 3. Este arreglo significó nueve medios con tres concentraciones hormonales (en

**Tabla 3.** Efecto del BAP, GA<sub>3</sub> e IBA en las etapas de propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *R. glaucus* Benth

Etapas	Reguladores del crecimiento		
	Bencil amino purina	Ácido giberélico	Ácido indol butírico
Establecimiento	(BAP mg/L)	(GA <sub>3</sub> mg/L)	(IBA mg/L )
M <sub>1</sub>	0,0	0,0	0,0
M <sub>2</sub>	1,0	0,5	0,0
M <sub>3</sub>	2,0	1,0	0,0
Multiplicación			
M <sub>4</sub>	0,0	0,0	0,0
M <sub>5</sub>	2,5	0,03	0,0
M <sub>6</sub>	2,5	0,05	0,0
Enraizamiento			
M <sub>7</sub>	0,0	0,0	0,0
M <sub>8</sub>	0,0	0,0	1,0
M <sub>9</sub>	0,0	0,0	2,0

cada etapa) en MS para cada uno de los diferentes materiales de *R. glaucus* Benth evaluados para un total de veinte y siete tratamientos. Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones, en donde cada replica estaba representada por un frasco de cultivo con un explante. Se realizó una análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente se hizo una comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5% para determinar cuáles de los tratamientos presentaban diferencias estadísticas significativas. Los datos fueron colectados durante 8 semanas. Se empleó el programa estadístico SPSS versión 19. Se realizaron análisis estadísticos de los datos para obtener el valor promedio y valores de dispersión. Asimismo, se realizó un análisis de varianza y en caso de existir diferencias estadísticas entre localidades se realizó la prueba Tukey de separación de medias. El modelo estadístico para realizar el ANDEVA fue completamente al azar con efecto anidado o jerárquico (Dytham, 2012).

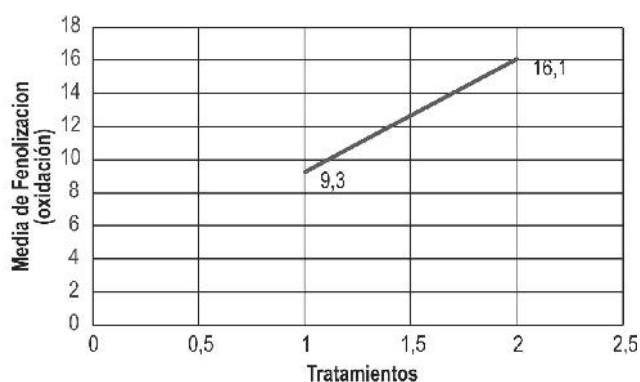
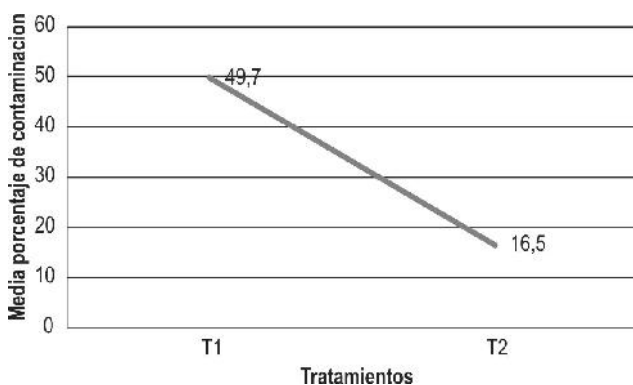
## Resultados y discusión

### Efecto de los tratamientos de desinfección en los materiales de las ocho fincas evaluadas en el estudio

Se presentaron diferencias significativas a un nivel del 5% ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$  de desinfección (figura 2). En el tratamiento  $T_1$  se observó una mayor contaminación en los materiales de las ocho fincas evaluadas. Debido a que los explantes fueron expuestos a menores tiempos con los agentes desinfectantes que con el tratamiento  $T_2$ . Sin embargo en el tratamiento  $T_2$  se presentó mayor oxidación. Por otra parte se observó que los genotipos de *R. glaucus* sin espinas presentaron menores porcentajes de contaminación que los genotipos con espinas. Posiblemente la presencia de las espinas favorece que diversos tipos de contaminantes permanezcan en los explantes incrementando la contaminación superficial. Los resultados contrastan con los observados por Valderrama et al., 2009 quienes registraron porcentajes entre 28 y

57% en *R. glaucus* SE. En este contexto es importante indicar que la selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida por las características del explante, y se establecen experimentalmente por ensayo y error (Pedraza-Manrique, 2008). El porcentaje de contaminación y por ende el de supervivencia de los explantes está fuertemente influenciado por varios factores como son: la época del año, el estado fisiológico de la planta, las condiciones ambientales y la morfología del explante. En el presente estudio, los materiales fueron recolectados en la época seca (meses de diciembre-marzo, junio-agosto) lo cual favoreció los bajos índices de contaminación. Por el contrario la recolección de los explantes por parte de Valderrama, Álvarez, Barro, Robayo y Nuñez (2009) fue efectuada en diferentes épocas del año lo cual posiblemente determinó niveles mayores de contaminación en los materiales del estudio de estos investigadores. Es importante señalar que lo más recomendable para el establecimiento de plantas *in vitro* es el empleo de explantes provenientes de plantas mantenidas en condiciones de invernadero, a las cuales se les debe realizar desinfección con fungicidas y bactericidas. Sin embargo, para el presente estudio no fue posible contar con plantas mantenidas en condiciones de invernadero. En lo que respecta a la fenolización u oxidación de los explantes con los dos tratamientos de desinfección en las microestacas se evidenció mayor oxidación en todos los materiales con el tratamiento  $T_2$  con respecto a  $T_1$ . Es importante destacar que el subcultivo de las yemas adventicias de las microestacas luego de una semana de cultivo permitió reducir la contaminación endógena hasta un nivel mínimo, sin necesidad de emplear procedimientos fuertes para la desinfección del material vegetal.

### Efecto de los medios de cultivo $M_1$ , $M_2$ y $M_3$ sobre la longitud y número de hojas en la fase de establecimiento en yemas meristemáticas de *R. glaucus* Benth



**Figura 2.** Efecto de los tratamientos de desinfección de los materiales *R. glaucus* Benth.

El efecto de los medios de cultivo sobre el desarrollo de los explantes durante la fase de establecimiento en los ocho materiales se observa en la tabla 4. Se encontraron diferencias significativas ( $P<0,05$ ), en número de hojas entre medios de cultivo, observándose un mayor crecimiento y desarrollo de ápices meristemáticos en el medio M3 lo que permitió una mejor formación de plántulas previo al inicio de la fase de multiplicación. Varios autores Muñoz y Reyes (2006), Sigarra y García (2011), han observado que en el cultivo de meristemas de *R. glaucus* Benth la utilización de AG<sub>3</sub> presenta los mejores desarrollos cuando se aplica en combinación con BAP. Tanto el número de hojas como el crecimiento en longitud fueron altos en relación a los otros tratamientos (17,8 hojas y 1,41 cm respectivamente) (tabla 4).

**Tabla 4.** Prueba de comparación múltiple de Tukey el efecto de los medios de cultivo sobre el número de hojas en la fase de establecimiento en yemas meristemáticas de *R. glaucus* Benth de ocho materiales evaluados.

Tratamiento	No de hojas		Porcentaje supervivencia
M <sub>3</sub>	14,538	a	82,2
M <sub>2</sub>	8,375	b	71,3
M <sub>1</sub>	2,975	c	65,3

Valores seguidos con diferente letra son significativamente diferentes con  $P<0,05$ , usando la prueba de rango múltiple de Tukey.

### Multiplicación de los brotes

Luego de cuatro semanas de establecidos los explantes en los medios de multiplicación se obtuvieron plantas en el medio M<sub>5</sub> en el cual alcanzaron mayores longitudes y números de brotes que los medios M<sub>4</sub> y M<sub>6</sub> ( $P<0,05$ ) (tabla 5). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P<0,05$ ) para las variables crecimiento promedio y número de brotes (tabla 5). Se observaron mejores resultados en el medio M<sub>5</sub> debido a una menor concentración de GA<sub>3</sub> y que en el medio M<sub>6</sub> e igual concentración de BAP. Es importante resaltar que el número de brotes obtenidos en todos

los materiales evaluados fueron menores a lo descrito por Sigarra y García (2011) (7,5), Villa, Gómez, Salles y Pascual (2009) (3,99) y Castro y Díaz 2001 (4,7). Para el caso de esta investigación es evidente que la gran diversidad de materiales de *R. glaucus* Benth SE y CE evaluados presentaron una respuesta muy heterogénea en la variable número de brotes. La diferencia en el número de brotes obtenidos puede ser el resultado de las diferencias de los diferentes genotipos evaluados.

### Enraizamiento in vitro

Los brotes se seccionaron y sembraron en el medio de enraizamiento y permanecieron por cuatro semanas hasta el desarrollo y formación de raíces. Se observaron los mejores resultados en el medio M<sub>9</sub>. El número promedio de raíces en este medio para los diferentes materiales evaluados fue muy homogéneo observándose de 4,3 a 3,3 raíces por planta a las cuatro semanas de cultivo (tabla 6). Igualmente el crecimiento en longitud de la raíces se presentó entre 4,9 y 2,1 cm. Estos resultados son similares a los obtenidos por Muñoz y Reyes (2006) en los cuales el efecto del IBA para la formación de raíces fue el mejor que el de otros reguladores como ácido indolacético (IAA) y ácido naftalenacético (ANA) para esta etapa. Los resultados alcanzados bajo este estudio son similares a los descritos por Castro *et al.*, (2006), quienes realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies de *Rubus* bajo la aplicación de ácido indolbutírico (IBA) en diferentes concentraciones, encontrándose que en concentraciones de IBA entre 1 y 3 mg/L inducen un porcentaje de enraizamiento del 100%. Igualmente Muñoz y Reyes (2006), indican una respuesta similar al anterior estudio es así ya que con 1,0 mg/L de IBA se obtienen plantas con mayor número de raíces y con 100% de plantas enraizadas.

### Conclusiones

El empleo de microestacas con yema axilar es una eficiente metodología para iniciar un proceso de micropropagación (figura 3) en diferentes genotipos de *R. glaucus* Benth, facilitando la obtención de plántulas libres de contaminantes para las siguientes fases del

**Tabla 5.** Prueba de comparación múltiple de Tukey del efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento promedio y el número de brotes en la fase de multiplicación en yemas meristemáticas de *R. glaucus* Benth de ocho materiales evaluados.

Tratamiento	Crecimiento promedio		Medio de cultivo	Numero de brotes		Porcentaje supervivencia
M5	2,156	a	M5	1,800	a	74,3
M4	1,188	b	M6	1,513	b	69,3
M6	1,075	b	M4	0,813	b	63,6

Valores seguidos con diferente letra son significativamente diferentes con  $P<0,05$ , usando la prueba de rango múltiple de Tukey.



**Tabla 6.** Comparación de medias de Tukey de los medios de cultivo M<sub>7</sub>, M<sub>8</sub> y M<sub>9</sub> en la fase de enraizamiento de segmentos nodales de *R. glaucus* en materiales provenientes de ocho finca

Medio de cultivo	Longitud de la raíz		Medio de cultivo	No Raíces/Planta		Porcentaje supervivencia
M <sub>9</sub>	3,675	a	M <sub>9</sub>	3,713	a	81,3
M <sub>7</sub>	2,313	b	M <sub>7</sub>	2,263	b	74,4
M <sub>8</sub>	1,813	b	M <sub>8</sub>	1,800	b	71,5

Valores seguidos con diferente letra son significativamente diferentes con P<0,05, usando la prueba de rango múltiple de Tukey.

proceso de micropropagación. Los mejores resultados observados para las fases de establecimiento y multiplicación de los ocho genotipos de *R. glaucus* Benth evaluados fueron M<sub>3</sub> (6 benzilaminopurina 6BAP 2,0 mg/L, Acido giberélico GA<sub>3</sub> 1,0 mg/L) y M<sub>5</sub> (6BAP 2,5 mg/L GA<sub>3</sub> 0,03 mg/L) respectivamente. Favoreciendo progresivamente la longitud, el desarrollo foliar y el número de brotes. La aplicación de ácido indolbutírico (IBA) 2,0 mg/L favorece el desarrollo radicular en los diferentes genotipos de *R. glaucus* Benth evaluados. Los ocho genotipos evaluados respondieron adecuadamente a la metodología desarrollada bajo este estudio lo cual la hace promisorio y apropiada para propagar masivamente estos materiales en la región de Pamplona y Chitagá (Norte de Santander, Colombia).

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Pamplona, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Territorial (proyecto 2008L72264-7141), a las asociaciones de cultivadores de mora de Pamplona y Chitagá (Aspagro, Aprochit, Sanfrimora y Aspri).

### Financiación

El presente trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Territorial y la Universidad de Pamplona, en Alianza con las Asociaciones de Cultivadores de Mora de los municipios de Pamplona y Chitagá (Norte de Santander, Colombia. Proyecto: Caracterización molecular de especies de mora (*Rubus* sp.) cultivadas y multiplicación clonal de accesiones promisorias con características de alta productividad y tolerancia a enfermedades código 2008L72264-7141. 2009-2011.

### Referencias

Bobrowski, V., Mello Farias, P., & Peters, J. (1996). Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. *Revista Brasileira de Agrociencia*, 2 (1), 17-20.

Broome, O., & Zimmerman, R. (1978). *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience*, 13,151-153.

Cancino Escalante, G., Sánchez-Montaño, L., Quevedo García, E., & Díaz Carvajal, C. (2011). Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* de los municipios de Pamplona

y Chitagá, región nororiental de Colombia. *Universitas Scientiarum*, 16 (3), 219-233.

Cancino Escalante, G., Quevedo-García, E., Villamizar, C., Sánchez Montaño, L., & Díaz Carvajal, C. (2014). Selección de materiales promisorios de mora (*R. glaucus* Benth) en los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. *Bistua*, 12 (1), 93-114.

Castro, D., & Díaz, J. (2001). Alternativas para el manejo integrado del cultivo de la mora de Castilla (*R. glaucus* Benth). Medellín, Colombia. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología Vegetal.

Castro, D., Díaz, J., Montoya, J., & Ríos, D. (2006). Micropropagación de especies de interés hortícola y forestal en bioreactores de inmersión temporal. *Revista Universidad Católica De Oriente*, 1, 63-71.

Clark, J., & Finn, Ch. (2011). *Blackberry Breeding and Genetics*. Recuperado de [http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/FVCSB\\_5%28SI1%2927-43o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/FVCSB_5%28SI1%2927-43o.pdf).

Cusba Mejía, M. (2011). Contribución al estudio de la huella genómica de genotipos élite de mora (*R. glaucus* Benth.) mediante marcadores SSRs. (Tesis de pregrado). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia.

DANE, (Departamento Nacional de Estadística). (2013). El cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) frutal de clima frío moderado, con propiedades curativas para la salud humana. Recuperado en [http://www.dane.gov.co/files/.../insumos\\_factores\\_de\\_produccion\\_nov\\_2013.pdf](http://www.dane.gov.co/files/.../insumos_factores_de_produccion_nov_2013.pdf).

Donnelly, D., & Daubeny, H. (1986). Tissue culture of *Rubus* species. *Acta Horticulturae*, 183,305-314.

Dytham, C. (2011). Choosing and Using Statistics. *A Biologist's Guide*. Oxford. Editorial: Willey-Blackwell.

González, M., López, M., Valdes, A., & Ordas, R. (2000). Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*, 137, 73-78.

Jennings, D. (1988). Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. London. Academic Press.

Marulanda, M., & Márquez, M. (2002). Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* Benth mediante marcadores moleculares RAPD. *Actualidades Biológicas*, 24, 31-36.

McPheeters, K., Skirvin, R., & Hall, H. (1988). *Brambles (Rubus spp.)*. *Biotechnology in agriculture*. London. Bajaj YPS.

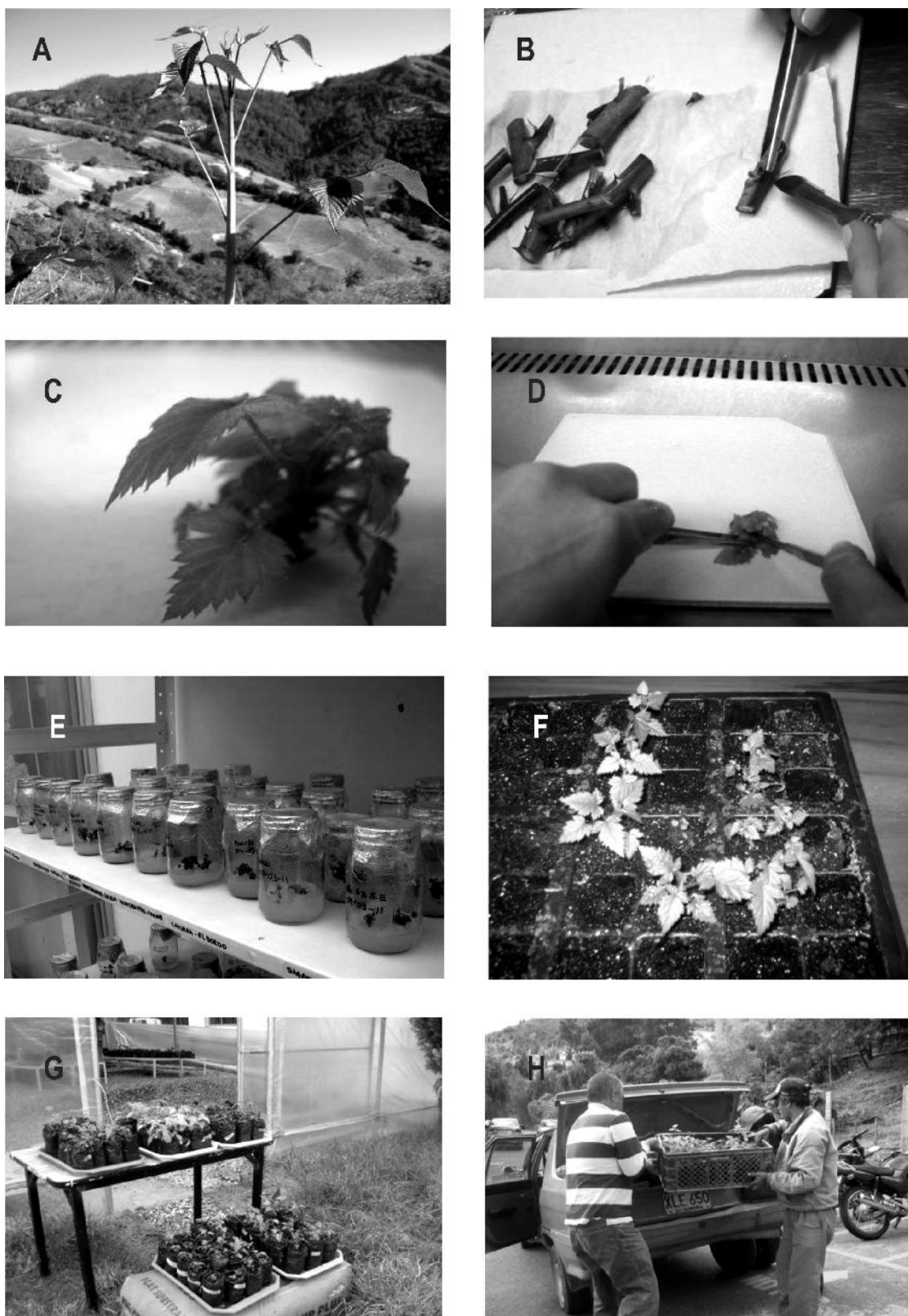
Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15,437-497.

Muñoz, I., & Reyes, H. (2006). Efecto de reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora de castilla (*R. glaucus* Benth). (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Recuperado de <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf01m967.pdf>.

Pedraza-Manrique, J. (2008). Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Bogotá, Colombia. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Seeram, N., Adams, L., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry,





**Figura 3.** Proceso de micropropagación de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth. **A.** Segmentos de tallo plantas seleccionadas. **B.** Corte de los segmentos de tallo a propagar en el laboratorio. **C.** Brotes obtenidos a las 4 semanas de siembra. **D.** Corte y selección de brotes. **E.** Desarrollo y elongación brotes *in vitro*. **F.** Establecimiento a condiciones *ex-vitro*. **G.** Materiales acondicionados en el invernadero. **H.** Entrega de los materiales micropropagados a los agricultores.

- cranberry red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cell *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329–9339.
- Sigarroa, A., & García, D. (2011). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronómica*, 60 (4): 347-354.
- Sobczykiewicz, D. (1992). Micropropagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.). En *high-tech and micropropagation*, (pp. 80-89). London: Bajaj YPS (ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, II. Springer.
- Tian, Y., Duan, X., & Wang, F. (2005). The effect of season on rapid propagation of raspberry. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 28, 18–21.
- Valderrama, A., Álvarez, R., Barrero, L., Robayo, M., & Núñez, V. (2009). Validación y escalamiento de plántulas de mora *in vitro* y manejo *ex vitro* para entrega a agricultores de Silvanía. En L. Barrero Meneses, Corpoica – Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (Ed.), *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado*. Pp. 64 – 75. Bogotá.
- Villa, F., Gomez, A., Salles, L., & Pascual, M. (2005). Multiplicação *In vitro* da amoreira-preta ‘Ebano’ em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência e Agrotecnologia*, 29 (3), 582 - 589.
- Wu, J., Miller, S., Hall, H., & Mooney, P. (2009). Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tissues and Organ Culture*, 99, 17–25.
- Zawadzka, M., & Orlikowska, T. (2006). Increase in the quality of raspberry cultures under the influence of FeEDDTA. *Acta Horticulturae*, 725, 161–164.
- Zimmerman, R. (1991). Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. En *Micropropagation*, Debergh PC, Zimmerman RH (Ed.), Kluwer. Pp. 231–246. The Netherlands.
- Zimmerman, R., & Galletta, O. (1980). Propagation of thornless blackberries by one cuttings. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 105(3), 405-407.

# Enhancement of germination, hyperhydricity control and *in vitro* shoot formation of *Vasconcellea stipulata* Badillo

## Mejoramiento de la germinación, control de la hiperhidricidad y formación de brotes en *Vasconcellea stipulata* Badillo

Diego Paúl Vélez-Mora\*, Rosa Armijos González\*\*, Miguel Jordán Zimmermann\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.43611

### Abstract

*Vasconcellea stipulata* has great commercial importance because of its enzymatic activity and as a source for genetic improvement of papaya since it is resistant to the papaya ringspot virus. However, due to its low regeneration by seeds and limited knowledge of its genetic and pharmaceutical properties, this species is not widely cultivated. For propagation, *in vitro* culture of seeds has been used to address this problem, but hyperhydricity, a physiological disorder, mainly expressed in the developing embryonic axis and specifically associated with this species, is a significant constraint. In order to obtain elite material for culture of *V. stipulata*, the aim of this work was to increase germination, to control hyperhydricity in embryos and to evaluate the potential to induce morphogenic responses, i.e., shoot formation. Our results showed that it is possible to increase germination up to 53% under *in vitro* conditions within a short period in the presence of hydrogen peroxide. In addition, hyperhydricity was significantly reduced (50%) *in vitro* when gibberellic acid concentrations were included on a 1/2 Nitsch and Nitsch nutrient medium, resulting in approximately 80% recovery of viable seedlings. Finally, other plant growth regulators were evaluated and found to trigger shoot formation in axillary buds as well as induce the formation of callus in leaf sections derived of seedlings.

**Key words:** germination, embryo culture, hyperhydricity.

### Resumen

*Vasconcellea stipulata* posee una gran importancia comercial debido a su actividad enzimática y como fuente para el mejoramiento genético de papaya, debido a su resistencia al virus de la mancha anular de esta especie. Sin embargo, debido a su baja regeneración por semillas y al limitado conocimiento de sus propiedades genéticas y farmacéuticas, esta especie no es cultivada ampliamente. La propagación a través del cultivo *in vitro* de semillas se ha usado para contrarrestar este tipo de problema, pero la hiperhidricidad, un trastorno fisiológico, expresado principalmente en los ejes embrionarios en desarrollo y asociado específicamente a esta especie, es una restricción significativa. Con el fin de obtener material de élite para el cultivo de *V. stipulata*, el objetivo de este trabajo fue incrementar la germinación, controlar la hiperhidricidad en embriones y evaluar el potencial para inducir respuestas morfogénicas, es decir, la formación de brotes. Nuestros resultados mostraron que es posible aumentar la germinación hasta un 53% en condiciones *in vitro*, dentro de un período más corto en presencia de peróxido de hidrógeno. Además, la hiperhidricidad se redujo significativamente (50%) en condiciones *in vitro* cuando se incluyó ácido giberélico en bajas concentraciones en el medio 1/2 Nitsch y Nitsch. Esto permitió recuperar hasta aproximadamente el 80% de plántulas viables. Finalmente, otros reguladores de crecimiento vegetal evaluados, indujeron la formación de brotes en yemas axilares y la formación de callos en secciones de hoja derivadas de plántulas.

**Palabras clave:** germinación, cultivo de embriones, hiperhidricidad.

**Recibido:** octubre 15 de 2014

**Aprobado:** septiembre 28 de 2015

\* Master in Characterization and Conservation of Biodiversity, Departamento de Ciencias Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. P.C. 1101608. San Cayetano Alto, Ecuador. dpvelez@utpl.edu.ec

\*\* Environmental engineer, Ph.D student. Departamento de Ciencias Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. P.C. 1101608. San Cayetano Alto, Ecuador. rearmijos@utpl.edu.ec

\*\*\* Ph.D in Plant Physiology and Plant Biotechnology. Instituto de Biotecnología. Universidad Mayor. Camino La Pirámide 5750, Huechuraba, Chile. mjordanz@gmail.com

## Introduction

*Vasconcellea stipulata* B. (toronche) represents a genetic resource to be used for the improvement of common papaya due to its resistance to the papaya ringspot virus disease (Magdalita *et al.*, 1997; Drew *et al.*, 1998). This and other different species and varieties of the genus *Vasconcellea* are also important due to their potential to confer desirable characteristics to babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* 'Babaco'), i.e. phytosanitary problems, cold tolerance and organoleptic characteristics (Guerrero & Castro, 1999) of interest to the nutritional and pharmaceutical industries.

Furthermore, this species has commercial importance as a source of papain (Guerrero & Castro, 1999). This proteolytic enzyme, present in the *Caricaceae*, shows in *V. stipulata* enzymatic activity up to 17 times higher than that reported in *Carica papaya* (Scheldeman, 2002). However, despite its attributes this species is threatened by habitat loss due to deforestation and the conversion of native forest to cropland or pasture (IUCN, 2003).

The generative form in several *Vasconcellea* species shows limited responses due to seed dormancy, low germination rates and long-term germination up to 240 days with high variability of germination responses between sites (Jiménez *et al.*, 1998; Scheldeman, 2002). Additionally, losses due to vulnerability of the sarcotesta to insects, pathogens and fungal attack are significant (Badillo, 1993). Therefore the establishment of efficient protocols is necessary for multiplication of new individuals, germplasm conservation and production of seedlings with better agronomic traits.

In this report, the specific aims were 1) To present some alternative protocols to increase the percentage of germination with the use of pre-germination treatments, 2) To reduce hyperhydricity tissue by modifying the culture medium and the application of gibberellins, 3) To stimulate shoot regeneration using growth regulators. The latter concerning sprouting of *V. stipulata* under *in vitro* conditions is reported here for the first time.

## Materials and methods

**Determination of viability.** The presence and viability of embryos were compared from three provenances: Loja, El Oro (Ecuador), and Ayabaca (Perú), using the triphenyl tetrazolium salt test (TZ) (ISTA, 2005).

***In vitro* germination.** To evaluate the effect of pre-germination treatments, seeds from Loja were used due to the proximity and availability of plant material. The elimination and/or weakening of the sclerotesta were assessed by the application of different concentrations of chemicals and exposure times: hydrogen peroxide (10, 50, 100 % for 20, 30 and 40 min), sulfuric acid (20, 40, 80 % for 10, 15 and 20 min) and sodium hypochlorite (1, 3, 4 % for 15, 20 and 30 min). The concentrations of each chemical are not equal, because

the effect of each is different. A total of 27 treatments and a control were applied. Table 2 shows the nine best results of all treatments in the results section. The seeds were then washed to remove residues of each of these substances by submerging them in water for 24 hours and were disinfected with 70% ethanol for 20 sec, followed by 1% sodium hypochlorite for 5 min, and then cultured in MS (Murashige and Skoog, 1962) medium under a photoperiod of 12 hours and photon flux density of 57  $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$  (white fluorescent light 40-W General Electric F40D-EX) and temperature of  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , for a period of six months.

**Control of hyperhydricity in germinated embryos.** During germination, a high percentage of embryonic axes and seedlings showed hyperhydricity symptoms; this caused a substantial loss of plant material. In order to avoid or reduce this constraint, the embryos were extracted from seeds submerged for 24 h in water and then cultured *in vitro*. To disinfect the seeds the same procedure as for *in vitro* germination was performed. Embryo extraction was followed by liquid immersion in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (10 Vol.) for 1 min., and embryos were then cultured in MS and NN (Nitsch and Nitsch, 1969) nutrient media at different concentrations plus gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ) to evaluate embryo hyperhydration. Both media contained 2% sucrose and were solidified with 0.7% agar (Bacto™ Agar, BD). The light regime, lamps and photon flux density were the same as for *in vitro* cultured seeds.

**Morphogenic responses.** Buds, leaf explants and hypocotyl explants were isolated from six-month old seedlings (approx. 6 cm) and cultured on NN medium with different combinations of plant growth regulators, including 0.54-1  $\mu\text{M}$  of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) or 6.8  $\mu\text{M}$  of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in combination with 0.5-2.2  $\mu\text{M}$  of 6-benzylaminopurine (BAP).

**Statistical analysis.** A factorial design was established for statistical analysis. Each treatment for germination, hyperhydricity and regeneration included five units (individual), five repetitions (flasks) and three replicates (total re-design). Data were registered periodically every five days. Variance analysis (ANOVA) was followed by comparison of the groups' means using the Duncan test at the  $p = 0.05$  level using the R software (R Development Core Team 2012).

## Results and discussion

**Presence of embryos and viability.** Seeds from Ayabaca showed the highest percentages of embryos and viability compared to those from El Oro and Loja (figure 1 a, b). Significant differences in the amount of empty seeds (without embryo) were found in the material collected at Loja, El Oro and Ayabaca (table 1). The high percentage of empty seeds may be due to the existing hybridization in the *Vasconcellea* genus, according to Kyndt *et al.* (2005 a, b) who stated that hybridization is common among species of the genus *Vasconcellea*,



with evidence of introgression of *V. cundinamarcensis* into *V. stipulata*, both under natural conditions, in the province of Loja (Horovitz & Jiménez, 1967) and in controlled conditions in Venezuela (De Zerpa, 1980). The material from Loja evidenced the greatest amount of fruit with incomplete and non-viable seeds, possibly because this is the center of diversification and hybridization of highland papayas (Scheldeman, 2002).

**Table 1.** Presence of embryos and embryo viability in seeds from three provenances examined with the triphenyl tetrazolium test.

Provenance	Complete seeds (%)	Viable embryos (%)
Loja	86.4 ± 5.2 <sup>b</sup>	80.3 ± 13 <sup>c</sup>
Ayabaca	100.0 ± 0 <sup>a</sup>	94.7 ± 6.7 <sup>a</sup>
El Oro	100.0 ± 0 <sup>a</sup>	82.4 ± 2.6 <sup>b</sup>

Results from 300 seeds/provenance. Statistically significant differences are indicated with different letters, with a significance level of 0.05 in the Duncan test.

**Table 2.** Influence of pre-germination treatment on the germination

Treatments	Concentration (%)	Germination (%)
Control	0	0.5±0.1 <sup>e</sup>
Hydrogen peroxide	100	52.6±7.2 <sup>a</sup>
	50	22.9±17.2 <sup>b</sup>
	10	19.0±4.0 <sup>bc</sup>
Sulfuric acid	80	3.0±1.7 <sup>e</sup>
	40	3.4±1.7 <sup>de</sup>
	20	7.7±7.4 <sup>cde</sup>
Sodium hypochlorite	4	16.4±5.5 <sup>bcd</sup>
	3	10.3±5.5 <sup>bode</sup>
	1	8.3±1.5 <sup>cde</sup>

Results from 75 seeds/treatment after 40 days. Statistically significant differences are indicated with different letters, with a significance level of 0.05 in the Duncan test. \*The best nine treatments presented in this table were exposed to 20 minutes hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, and 30 minutes to sulfuric acid, more a control.

**Germination.** The use of hydrogen peroxide increased the germination rate (figure 1c), evidencing significant differences in comparison with the other pre-germination treatments (sulfuric acid and sodium hypochlo-

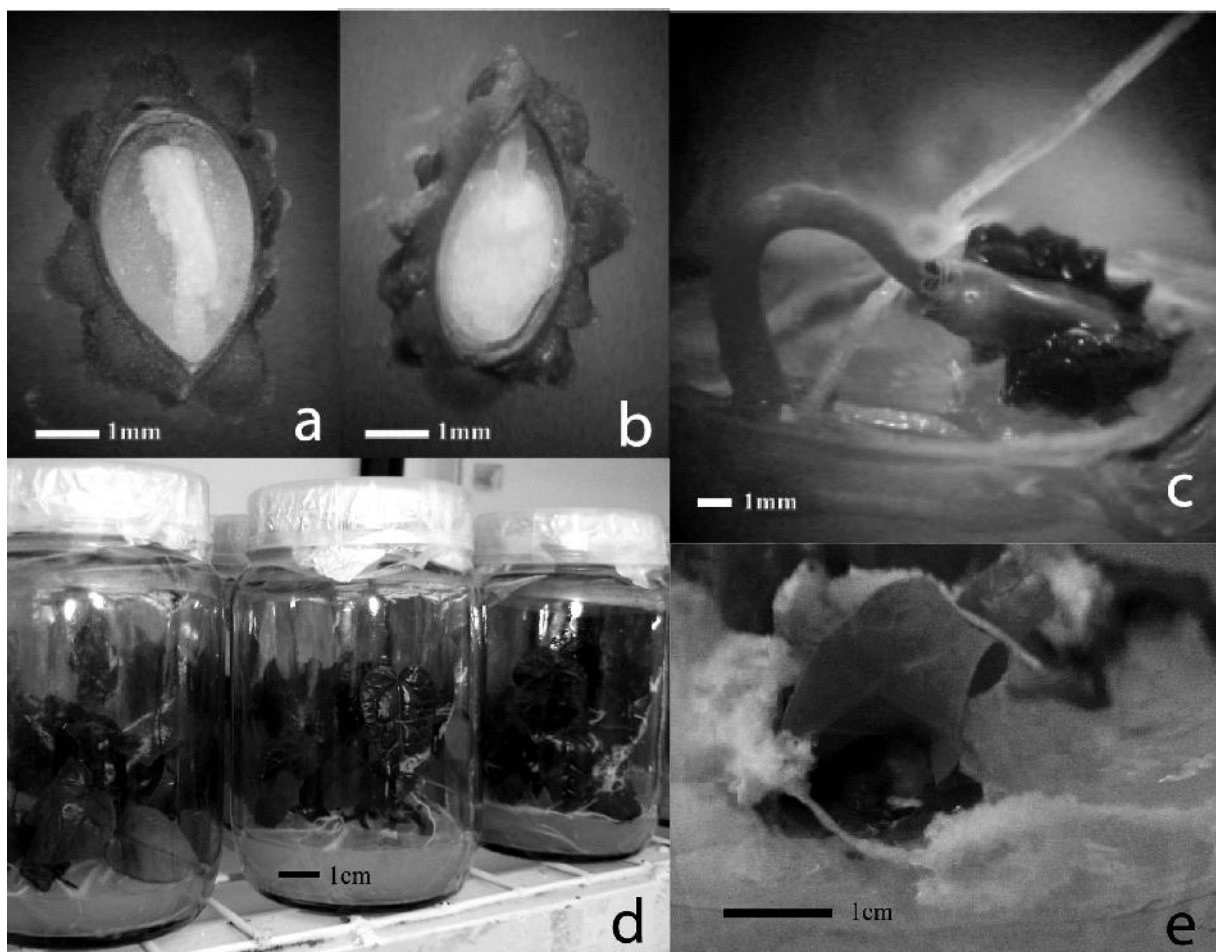
rite) (table 2). According to Scheldeman (2002), the presence of sulfuric acid affects the structure of the embryo and the sarcotesta, limiting responses. By contrast, hydrogen peroxide enabled maximum germination, equivalent to 52.6% by placing the seeds at a concentration of 100% for 30 minutes, after 40 days. This percentage was significantly higher than the control treatment and the results reported by Jiménez *et al.* (1998) and Scheldeman (2002) where germination was about 0-5% and 32% over 174 days, respectively. The application of hydrogen peroxide has been used to promote germination in several species (Dolatabadian & Modarres-Sanavy, 2008). Although its mechanism is not understood (Klein *et al.*, 2008), it has been mainly attributed to a strong oxidant effect on organic matter (Moreno *et al.*, 2007) coupled with the destruction of some inhibitors present in the outer layers of the seed, including phenols and other compounds, thus enabling gases and moisture to reach the embryo.

According to our results and several other studies, the low germination rates in the species of this genus is not a result of viability loss due to storage or to origin sites of *V. stipulata*; instead, it would be more attributable to the high site-specific variability existing in the genus (Horovitz & Jiménez, 1967). *Carica* and *Vasconcellea* seeds are very similar in structure (Badillo, 2000) and both groups require treatment to promote germination. In *Vasconcellea* the often-irregular germination could be improved by removal of the sarcotesta and application of GA<sub>3</sub> (Scheldeman, 2002). In *Carica papaya* the sarcotesta and inhibitors present in the fruit can prevent germination, but the effect can be reduced by the application of gibberellic acid and/or potassium nitrate (Pérez *et al.*, 1980; Yahiro & Oryoji, 1980).

**Embryo germination and hyperhydricity control.** Despite having obtained a relatively high *in vitro* germination percentage in full seeds by the use of hydrogen peroxide, this was surpassed by isolated embryo culture. The highest germination percentage (80%) was obtained with ½ strength of NN salts in the culture medium in the presence of 1.44 µM GA<sub>3</sub> (figure 1d). This is consistent with other reports about the application of GA<sub>3</sub> promoting the germination of intact seeds in *V. stipulata*, *V. cundinamarcensis* and *V. x heilbornii* (Scheldeman, 2002). Pérez *et al.* (1980) also reported that GA<sub>3</sub> significantly promoted germination in *C. papaya* seeds accelerating the transport of nutrients via the endosperm.

Hyperhydricity produces an abnormal anatomy in seedlings of many species, especially in young leaves and hypocotyls that appear swollen and translucent (Acram *et al.*, 1996; Ziv, 1991) and is extremely frequent in seedlings and tissues of *V. stipulata* (figure 1e). Many factors cause this effect, including a high concentration of nutrient salts or nitrates (Ziv & Ariel, 1992; Ivanova & Standen, 2008). Thus, in *C. papaya* and some *Vasconcellea* species, the use of ½ MS salts





**Figure 1.** Seed structure, germination and hyperhydricity of *V. stipulata* (seeds from Loja-Ecuador). **a, b** Longitudinal, median section of an imbibed seed, **c** External structure of germinating seed with application of hydrogen peroxide, **d** Germinating embryo and root with mild signs of hyperhydricity growing on NN medium supplemented with  $1.44 \mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> and **e** Leaf section and roots with signs of hyperhydricity.

(De Winnaar, 1988) and/or media with low nitrate levels as NN and woody plant medium (Jordán, 1986; Jordán and Piwanski, 1997) allowed survival and good quality of the plants, the same as in *V. pubescens*. Current results in *V. stipulata* apparently showed a lower hyperhydricity in the seedlings developed in presence of both, full MS nutrient medium and in more diluted media (NN,  $\frac{1}{2}$  NN salts), reaching levels of hyperhydricity between 6.7 to 13.3%. Another factor that can influence hyperhydricity is the type of agar (Ziv, 1991). In this case the Agar™ Bacto helped to keep hyperhydricity low, with only 13.3% of tissue affected (table 3). A similar result has been reported by Marga *et al.* (1997) and Ascencio *et al.* (2008), although the responses depend mainly on agar concentration as well as its preparation (Loreti & Pasqualetto, 1986).

Therefore, to establish a protocol for tissue culture in this species, it is recommended to use seeds from Ayabaca, Peru and El Oro, Ecuador, due to their high percentage of viability and germination. In addition, to start growing from seed or embryo,  $\frac{1}{2}$  NN with

low concentrations of gibberellins can be used, as this favors a high percentage of germination and maintains controlled tissue hyperhydricity. These results could be used not only for growing *V. stipulata* but also for the *in vitro* culture of *C. papaya*, since the latest results show that even this crop has high percentages of hyperhydricity in leaves and roots of material from the somatic embryo's mature cotyledon (Clarindo *et al.*, 2008, Koehler 2013).

**Morphogenic responses.** The morphogenic responses of the various organs of *V. stipulata* are summarized in table 4. A wide range of inductive responses was observed in nodal segments: sprouting of axillary buds with up to 4 new buds per explant and profuse induction of callus. A relatively low level of NAA (on the order of  $0.5 \mu\text{M}$ ) and a similar concentration of BAP induced indirect shoot regeneration from leaves. According to results for *C. papaya* (De Winnaar, 1988) and in *C. pubescens*, the multiplication from axillary buds is similarly achieved in the presence of  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP,  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  GA<sub>3</sub> and  $126 \text{ mg l}^{-1}$  phloroglucinol (Jordán, 1992).

**Table 3.** Influence of nutrient media composition and GA<sub>3</sub> levels on in vitro embryo germination.

Culture medium	GA <sub>3</sub> (μM)	Germination (%)	Hyperhydricity in embryonic axes (%)
NN 50%	0	60.0 <sup>a,b</sup>	6.7 <sup>a,b</sup>
	1.4	80.0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
	2.9	73.3 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a,b</sup>
	4.3	53.3 <sup>a,b,c</sup>	6.7 <sup>a,b</sup>
NN 100%	0	13.3 <sup>c</sup>	6.7 <sup>a,b (1)</sup>
	1.4	20.0 <sup>b,c</sup>	6.7 <sup>a,b</sup>
	2.9	26.7 <sup>b,c</sup>	6.7 <sup>a,b</sup>
	4.3	16.7 <sup>b,c</sup>	13.3 <sup>a</sup>
MS 50%	0	46.7 <sup>a,b,c</sup>	13.3 <sup>a</sup>
	1.4	53.3 <sup>a,b,c</sup>	0 <sup>b</sup>
	2.9	46.7 <sup>a,b,c</sup>	6.7 <sup>a,b</sup>
	4.3	53.3 <sup>a,b,c</sup>	13.3 <sup>a</sup>
MS 100%	0	13.3 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
	1.4	13.3 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
	2.9	20.0 <sup>b,c</sup>	0 <sup>b</sup>
	4.3	20.0 <sup>b,c</sup>	0 <sup>b</sup>

Results from 75 embryos/treatment, after 40 days. Statistically significant differences are indicated with different letters, with a significance level of 0.05 in the Duncan test. <sup>(1)</sup> Level in tissues hyperhydricity: 0-6.6 % = no hyperhydricity, 6.7-13.2% = moderate, 13.3 and up = high

Reports on babaco showed shoot formation in leaf explants, although not on the leaf lamina but predominantly on the pre-existing nodular structures arranged in the central venation of the leaf (Jordán & Piwanski, 1997). However, for *V. stipulata* (this work) the nodular structures did not express any morphogenic responses under the various plant growth regulator combinations tested. The shoots exhibited a compressed structure, as it has also been reported for other *Caricaceae* (Mondal *et al.*, 1994). Growth can be triggered subsequently by subculture on media with the application of 1.44 μM GA<sub>3</sub> only.

Callus formation and regeneration of new tissues were low in leaf tissues. The opposite occurred with the hypocotyl where dedifferentiation of tissues was evident in most combinations of growth regulators, but these were not morphogenic. In other species and hybrids of the same family the formation of embryogenic callus was reported when cultured in medium with high concentrations of 2,4-D (Chen *et al.*, 1991; Fitch, 1993).

### Conclusion

Significant differences in *V. stipulata* seed viability between the three provenances were observed. The highest percentage of viability was observed in seeds from Ayabaca. The evaluation of different pre-germination treatments, determined that hydrogen peroxide at 100% promotes seed germination up to 53%. The culture of isolated embryos in 1/2 NN medium increases germination and controls hyperhydricity. Finally, to promote the production of shoots, nodal segments should be grown in 1/2 NN medium supplemented with NAA and BAP.

**Acknowledgments.** We thank Diana Ochoa for her assistance in this study. We especially thank the authorities of the Universidad Técnica Particular de Loja for their support of this research and all members of the Departamento de Ciencias Naturales/UTPL and Institu-

**Table 4** Effect of growth regulators on morphogenic responses of three types of explant

NN supplemented with		Nodal segments		Leafs		Hypocotyls	
(μM)	(μM)	Shoot / explant	Callus (%)	Shoot / explant	Callus (%)	Shoot / explant	Callus (%)
1 NAA	2.2 BAP	0.0 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0.5 NAA	0.5 BAP	1.5 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
0.5 NAA	2 BAP	2.3 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
0.54 NAA	2 BAP	4.0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
6.8 2,4-D	2 BAP	1.3 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>

Results from 75 explants /treatment, after 60 days. Statistically significant differences are indicated with different letters, with a significance level of 0.05 in the Duncan test.

to de Biotecnología/Universidad Mayor. We also thank Mrs. Andrée Goreux for correction of the manuscript.

## References

- Acrum, M. T., Richard, R. W. & Warren, H. S. (1996). Comparative anatomy of four rare Australian plants grown *in vitro*. *Botanic Gardens Micropropagation News*, 2(2), 20-25.
- Ascencio, A., Gutiérrez, H., Rodríguez, B. & Gutiérrez, A. (2008). Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturae*, 118(1), 155-160.
- Badillo, V. (1993). Caricaceae, Segundo Esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela*, 43(1), 1-111.
- Badillo, V. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcellea* St. Hill (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10(1), 74-79.
- Chen, M. H., Chen, C. C., Wang, D. N. & Chen, F. C. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, 69(19), 1913-1918.
- Clarindo, W.R., Carvalho, C. R., Araújo, F. S., Abreu, I. S. & Otoni, W. C. (2008). Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1), 207-214.
- De Winnaar, W. (1988). Clonal propagation of papaya *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12(1), 305-310.
- De Zerpa, D. M. (1980). Comportamiento meiótico de la descendencia híbrida producida al transferir el carácter bisexual de *Carica pubescens* a *Carica stipulata*. *Revista Facultad de Agronomía (Maracay)*, 11(1), 5-47.
- Drew, R., O'Brien, C. & Magdalita, P. (1998). Development of *Carica* interspecific hybrids. *Acta Horticulturae*, 461(1), 285-292.
- Dolatabadian, A. & Modarres-Sanavy, S. (2008). Effect of the ascorbic acid, pyridoxine and hydrogen peroxide treatments on germination, catalase activity, protein and malondialdehyde content of three oil seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36(2), 61-66.
- Fitch, M. M. M. (1993). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 205-212.
- Guerrero, D. & Castro, S. (1999). Cultivo de babaco en Loja. Universidad Nacional de Loja. Proyecto VLIR. Pp 10-30.
- Horovitz, S. & Jiménez, H. (1967). Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricaceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agronomía Tropical*, 17(1), 323-243.
- ISTA (International Seed Testing Association), (2005). International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, CH-Switzerland.
- IUCN. (2003). The IUCN red list of threatened species. IUCN Species Survival Comisión. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK.
- Ivanova, M. & Van Staden, J. (2008). Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1), 227-231.
- Jiménez, Y., Romero, J., & Scheldeman, X. (1998). Colección, caracterización y descripción de *Carica* x *heilbornii* nm. pentagona B.; *Carica pubescens* (A.DC) Solms-Laub y *Carica stipulata* B., en la provincia de Loja. *Revista de Difusión Técnica y Científica de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Nacional de Loja*, 29(1), 43-54.
- Jordán, M. (1986). Somatic embryogenesis from cell suspension cultures in *Carica candamarcensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 7(1), 257-251.
- Jordán, M. & Piwanski, D. (1997). Regeneration of babaco [*Carica pentagona* (Heilborn) Badillo] using leaf explants and shoot-tip culture. *PHYTON*, 61(1/2), 109-115.
- Jordán, M. (1992). Micropropagation of Papaya (*Carica* sp.). In: Bajaj Y. P. S. 1992. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Berlin. Verlag. 18, 418-459.
- Klein, J. D., Wood, L.A. & Geneve, R.L. (2008). Hydrogen peroxide and color sorting improves germination and vigor of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*) seed. *Acta Horticulturae*, 782(1), 93-98.
- Koehler, A. D., Carvalho, C. R. & Abreu, I. S. (2013). Somatic embryogenesis from leaf explants of hermaphrodite *Carica papaya*: a new approach for clonal propagation. *African Journal of Biotechnology*, 12(18), 2386-2391.
- Kyndt, T., Romeijn, E., Van Droogenbroeck, B., Romero, J., Gheysen, G. & Goetghebeur, P. (2005a). Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *American Journal of Botany*, 92(6), 1033-1044.
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Romeijn, E., Romero, J., Scheldeman, X., Goetghebeur, P., Van Damme, P. & Gheysen, G. (2005b). Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1) 442-459.
- Loreti, F. & Pasqualetto, P. (1986). Vitrification of plants culture *in vitro*. *Proceedings of the International Plant Propagators Society*, 36(1), 66-71.
- Magdalita, P., Drew, R., Adkins, S. & Godwin, I. (1997). Morphological, molecular and cytological analysis of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1), 224-229.
- Marga, F., Vebret, L. & Morvan, H. (1997). Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49(1), 1-5.
- Mondal, M., Sukumar, G. & Banran, B. (1994). Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (Var. Honey Dew). *Plant Cell Reports*, 13(1), 390-393.
- Moreno, J., Sarria, V., Polo, A. & Giraldo, L. (2007). Evaluación del peróxido de hidrógeno en la oxidación de fenol con hierro soportado sobre tela de carbón activado. *Información Tecnológica*, 18(2), 67-72.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth at bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-97.
- Nitsch, J. P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(3863), 85-87.
- Pérez, A., Reyes, M. & Cuevas, J. (1980). Germination of two papaya varieties: effect of seed aeration, K-treatment, removing of the sarcotesta, high temperature, soaking in distilled water and age of seeds. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 64(1), 164-172.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Scheldeman, X. (2002). Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. PhD Thesis. Faculty of Agricultural and applied Biological Sciences, University Ghent. Belgium. p 165.
- Yahiro, M. & Oryoji, Y. (1980). Effects of gibberellin and cytokinin treatments on the promotion of germination in papaya, *Carica papaya* L., seeds. *Memoris of the Faculty of Agriculture*, 16(1), 45-51.
- Ziv, M. (1991). Quality of micropropagated plants - vitrification. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 27(1), 64-69.
- Ziv, M. & Ariel, T. (1992). On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation. *Acta Horticulturae*, 314(1), 121-129.

# Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de “panela” con gránulos de kéfir de agua

## Antifungal capacity of cell-free supernatants obtained from fermentation of a substrate of brown sugar with water kefir grains

Caro Vélez, C.A\*, León Peláez, A.M\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.42758

### Resumen

El kéfir de agua (KA) es una bebida fermentada medianamente ácida elaborada con soluciones azucaradas y fermentada por un consorcio de microorganismos, principalmente bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras (LEV), embebidas en un polisacárido llamado gránulo de KA. La presencia de hongos y sus toxinas es un problema de la producción de alimentos, como *Aspergillus ochraceus* y sus micotoxinas especialmente en café y vino. Entre algunas alternativas que se han evaluado para su inhibición se incluyen las bacterias ácido lácticas y productos fermentados en general.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la capacidad del KA en inhibir o retrasar el crecimiento de *A. ochraceus*. Se emplearon 8 sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de diferentes fermentaciones de panela con gránulos de KA y con diferentes concentraciones de ácidos orgánicos (láctico y acético). Se hicieron fermentaciones con gránulos de KA en solución de panela por periodos de 32,5 h, a 25, 30 y 37 °C. Se determinaron la cinética de acidificación; el incremento de biomasa y se hizo el recuento de los grupos de microorganismos que componen el gránulo. A 25 °C se determinó el mayor aumento de biomasa (92%). La temperatura de fermentación afectó el recuento de los microorganismos que conforman el gránulo, principalmente las BAL, disminuyendo su cantidad a la máxima temperatura de fermentación (37 °C) ( $1 \times 10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), comparado con la mínima temperatura (25 °C) ( $6 \times 10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). El fermento que presentó mayor actividad antifúngica fue el SLC5 (pH: 3,2; temperatura de fermentación: 30 °C). El poder inhibitorio se atribuyó a los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación, aunque no se puede descartar que hayan actuado otras sustancias no cuantificadas.

Se pudo comprobar que el KA puede fermentar y aumentar su biomasa en un sustrato como el agua de panela y que sus SLC tienen la capacidad de reducir el crecimiento de *A. ochraceus*.

**Palabras clave:** ácido láctico, ácido acético, antifúngico, *Aspergillus ochraceus*, kéfir de agua, panela.

### Abstract

Water kefir (WK) is a moderately sour fermented beverage elaborated in sugar-containing solutions through fermentation by a microorganism consortium, principally lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, embedded in a matrix of polysaccharide so-called WK grains. The presence of fungi and their toxins it is a problem for the food industry, such as *Aspergillus ochraceus* and their mycotoxin production especially in coffee and wine. Some alternatives that have been evaluated for their inhibition include lactic acid bacteria and generally fermented products. The main objective was to evaluate the capacity of WK to ferment a Colombian beverage made with Panela and to assess capability of this product to retard the germination of a common toxigenic fungi like *Aspergillus ochraceus*. 8 cell-free supernatants (CFS) were obtained from separate fermentations and with different organic acids (OA) concentrations (e. g., lactic and acetic). Different fermentations were conducted with WK in Panela broth during 32.5 h periods at 25, 30, and 37°C. We determined the kinetics of acidification of WK along with the corresponding increment in biomass and conducted a quantitation of microorganisms groups that composed the grain. The greatest biomass increase occurred at 25 °C (92%); but the fermentation temperature affected the composition of microorganisms conforming the grain, with the quantity of LAB decreasing at the highest fermentation

\* Grupo BIOALI, Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108. Medellín, Colombia. carlos.caro@udea.edu.co

\*\* Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115. (1900). La Plata, Argentina. anleon@biol.unlp.edu.ar



temperatures (37 °C) ( $1 \times 10^6$  cfu ml<sup>-1</sup>), compared with the minimum temperature (25 °C) ( $6 \times 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>). The CFS5 (pH 3.2; fermentation temperature 30 °C) exhibited the greatest antifungal activity. We attribute the inhibitory power of these ferments to the OA produced during fermentation, although we cannot discard the possibility of the action of other substances not specifically quantified. We concluded that WK can grow and fermentate Panela broth and that its CFS can exert an antifungal effect against *A. ochraceus*.

**Key words:** lactic acid, acetic acid, antifungal compounds, *Aspergillus ochraceus*, water kefir, panela.

**Recibido:** diciembre 16 de 2014

**Aprobado:** octubre 20 de 2015

## Introducción

El crecimiento de especies fúngicas es una de las causas más frecuentes del deterioro de los alimentos, conlleva grandes pérdidas económicas y puede desarrollar problemas en la salud pública debido a la producción de micotoxinas. *Aspergillus ochraceus* es un moho aislado de un amplio rango de alimentos, crece en climas cálidos y tropicales, y es productor de Ocratoxina A (OTA) (Soriano, 2007), una micotoxina nefrotóxica que también puede tener propiedades hepatotóxicas, teratogénicas e inmunosupresivas, clasificada por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como posible carcinógeno humano (categoría 2B) (O'Callaghan *et al.*, 2006). La OTA puede sobrevivir a procesos típicos en la industria de alimentos, encontrada en pan horneado (Scudamore *et al.*, 2003), cerveza (O'Callaghan *et al.*, 2006) y café (Frank, 1999; Urbano *et al.*, 2001; Taniwaki *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004). Algunos fungicidas de origen químico son efectivos en el control del crecimiento de mohos perjudiciales, pero su uso se considera indeseable debido a la posibilidad de que permanezcan residuos peligrosos en las materias primas y/o alimentos, que ponen en riesgo la salud de los consumidores. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos métodos de conservación de los alimentos ha sido direccionada hacia métodos más naturales. Por muchos años los consumidores han demandado la conservación de alimentos sin preservantes de origen químico. El uso de sustancias de origen biológico con propiedades antifúngicas podría ayudar a la industria de alimentos a cumplir este requerimiento. Una posible solución a estas demandas podría ser el empleo de productos acidificados naturalmente como como el kéfir, cuya actividad antifúngica y sus metabolitos se han estudiado previamente (Gamba *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2014; Garrote *et al.*, 2000). El KA es una bebida fermentada medianamente ácida que entre otros compuestos contiene CO<sub>2</sub> y etanol (Garrote *et al.*, 2001) y para su elaboración se emplean soluciones azucaradas que son fermentadas por un consorcio de microorganismos, que se encuentran embebidos en una matriz de polisacárido conocido como gránulo de KA (Walldherr *et al.*, 2010), con forma irregular y de aspecto gelatinoso. El consorcio de microorganismos está conformado por bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras (LEV) y bacterias ácido acéticas (BAA) (Walldherr *et al.*, 2010; Diniz, *et al.*, 2003) que conviven en simbiosis.

La fermentación y la transferencia de los gránulos de KA pueden darse bajo condiciones no estériles, prácticamente sin riesgo de contaminarse. Dicha relación simbiótica es muy estable, ya que no permite un extenso crecimiento de microorganismos foráneos (Moinas, *et al.*, 1980; Pidoux, 1989). Al parecer la estabilidad del gránulo se basa en el efecto del pH y la presencia de compuestos inhibitorios o sustancias antagónicas que actúan contra patógenos externos contaminantes (Pidoux, 1989). Los microorganismos embebidos en el gránulo de KA son capaces de producir ácido láctico, ácido acético y otros compuestos biológicamente activos que podrían inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos e indeseables (Silva *et al.*, 2009) a partir de la fermentación de un sustrato azucarado de cualquier tipo. En esta investigación se empleó panela, un edulcorante obtenido mediante la extracción y evaporación de los jugos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) (Ministerio de la Protección Social, República de Colombia, 2006). Es un tipo de azúcar natural e integral, no centrifugado y sin refinar, más barato que la sacarosa (azúcar de mesa); y fue usado como sustrato para la fermentación por los gránulos de KA.

Una vez tiene lugar la fermentación del sustrato, se reducen gran cantidad de carbohidratos que son transformados principalmente a productos de bajo peso molecular que exhiben propiedades antimicrobianas, siendo los más comunes los ácidos orgánicos (AO) (Gerez *et al.*, 2009). Su acción está basada en la "teoría de los ácidos débiles", debido a que pueden lograr la disminución del pH intracelular de microorganismos, por la acción de las porciones no disociadas de tales ácidos debido a su pK<sub>a</sub> (Bogaert & Naidu, 2000; León *et al.*, 2012). Este fenómeno se debe a las propiedades hidrofóbicas que exhiben la mayoría de los AO, lo que les permite la libre difusión de su forma protonada a través de la membrana celular. Este proceso toma lugar espontáneamente debido a los gradientes de pH y osmolaridad que existen entre el interior y el exterior celular, siendo el pH intracelular más alto que el extracelular, por lo que los ácidos son libremente permeables en la membrana de los microorganismos, disociándose en el citoplasma y disminuyendo el pH por la liberación de protones (Bogaert & Naidu, 2000; León *et al.*, 2012). Estos desestabilizan el pH intracelular rompiendo su neutralidad y el gradiente de la membrana celular (Salmond *et al.*, 1984; León *et al.*, 2012). La célula emplea su energía en forma de ATP



para expulsar el protón y mantener su viabilidad, pero gasta esa energía que es necesaria para su cinética de crecimiento (Hunter & Segel, 1973; León *et al.*, 2012). El principal objetivo de este estudio fue investigar la capacidad de sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos de la fermentación de una solución de panela (4,15 %m/v) por los gránulos de KA (10 %m/v), en inhibir o retrasar el crecimiento *in vitro* del moho toxigénico *A. ochraceus* AFUNL9 y FNSP. Otros objetivos que tuvo esta investigación fueron: i) Se comparó la actividad antifúngica de los productos fermentados por gránulos de KA con soluciones de panela acidificadas artificialmente con ácidos fuertes (HCl 3M) o con ácidos orgánicos puros (láctico y acético). ii) Se evaluaron las condiciones tecnológicas de fermentación con los gránulos de KA. iii) La producción de biomasa y iv) El recuento de microorganismos (BAL, levaduras y bacterias ácido acéticas) en cada una de las temperaturas de fermentación evaluadas (25, 30 y 37 °C).

## Materiales y métodos

### Cultivo de los gránulos de kéfir de agua

Los gránulos de KA fueron cedidos a través de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata (La Plata, Argentina). Éstos fueron cultivados continuamente cada 48 h en solución acuosa de panela recién preparada, previa ebullición, fermentada a 25 °C.

### Proceso de fermentación

El sustrato empleado para la fermentación fue preparado con panela en polvo, obtenida en un supermercado local (Éxito®, Medellín, Colombia), usando agua de grifo como se hace en la preparación tradicional en Colombia. Todas las soluciones fueron calentadas hasta ebullición por un periodo de 1 min.

Se empleó una concentración de panela de 41,5 g L<sup>-1</sup>, similar a la empleada tradicionalmente. Cuando las soluciones alcanzaban la temperatura ambiente se inocularon con 10% m/v de gránulos de KA. Se empleó un blanco sin la adición de gránulos de KA. Todas las soluciones fueron fermentadas a tres diferentes temperaturas (25, 30 y 37 °C).

### Determinación de las cinéticas de fermentación y del incremento de biomasa

Los valores de pH fueron determinados cada 30 minutos durante 12 h y luego a las 24, 28 y 32,5 h de fermentación con un potenciómetro digital (Thermo Electron Corp., USA). La biomasa fue determinada con el peso escurrido de los gránulos empleando una balanza analítica (Ohaus, USA) durante 10 días.

## Identificación y relación de los grupos de microorganismos presentes en el kéfir de agua

Luego de realizar la fermentación del sustrato de panela por 32,5 h a tres temperaturas (25, 30 y 37 °C), la enumeración de los microorganismos viables en la bebida fermentada y preparada con 41,5 g L<sup>-1</sup> de panela se llevó a cabo en tres diferentes medios de cultivo, De Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Merck, Darmstad, Alemania) como medio para el crecimiento de BAL, agar-oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura (OGY) (Merck, Alemania) para las levaduras, y para el recuento de las BAA agar manitol, preparado con D-manitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), extracto de levadura (Oxoid, Cambridge, Inglaterra), peptona (Dibico, México D.F. México), y agar (Merck, Alemania) (Hernández *et al.*, 2008).

### Obtención de los sobrenadantes libres de células

Cuando la fermentación alcanzó los pH finales, (tabla 1) establecidos por la duración de la fermentación a las tres temperaturas (25, 30 y 37 °C), las soluciones acuosas de panela fermentada por los gránulos de KA se filtraron por un tamiz con un tamaño de malla de 1 mm<sup>2</sup>, con el objeto de separar los gránulos del sustrato fermentado. Los fermentos obtenidos se centrifugaron a 6000 rpm por 15 minutos. (Hettich, Tuttlingen, Alemania) en tubos plásticos tipo Falcon de 15 ml de capacidad, para separar las bacterias y demás partículas tras la fermentación. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de una membrana estéril con un tamaño de poro de 0,45 µm (Advantec MFS, Dublin, CA, USA) usando un portafiltros de polisulfona estéril (Advantec MFS) con succión de aire para generar vacío. Algunos SLC (SLC3, SLC5 y SLC7) fueron sometidos a ebullición por 5 minutos. Todos los SLC (tabla 1) se almacenaron a -20 °C hasta su posterior empleo.

**Tabla 1.** Sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos por fermentación de la solución acuosa de panela (4,15%) con los gránulos de KA (10%).

Sobrenadante libre de células (SLC)	Tiempo de fermentación (h)	Temperatura de fermentación (°C)	pH final
SLC1	9	25	4,0
SLC2	32,5	25	3,6
SLC3	3,5	30	4,0
SLC4	11,5	30	3,5
SLC5	32,5	30	3,2
SLC6	2,5	37	4,0
SLC7	8	37	3,5
SLC8	32,5	37	2,8

### **Análisis de los sobrenadantes libres de células**

Los ácidos orgánicos (AO) (láctico y acético) y los carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) fueron analizados por HPLC (Agilent Technologies series 1200, Santa Clara, CA, USA) empleando una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA). Se utilizó como fase móvil  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,008N a un caudal de  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  y a una temperatura de  $35^\circ\text{C}$ . Se empleó como modo de detección el UV-Visible para el ácido láctico y el índice de refracción para el ácido acético y los carbohidratos. Los AO y los carbohidratos fueron identificados de acuerdo al tiempo de retención comparada con las soluciones estándar de ácido láctico (Merck, Alemania), ácido acético (Carlo-Erba, Italia) y de los carbohidratos sacarosa, glucosa y fructosa (Merck, Alemania).

### **Preparación del inóculo de *Aspergillus ochraceus***

*Aspergillus ochraceus* AFUNL9, aislado de muestras de cereales, proveniente de la cátedra de microbiología de la Universidad Nacional de la Plata (La Plata, Argentina) y *A. ochraceus* FNSP aislado de muestras ambientales y proveniente del laboratorio de Salud Pública de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia); fueron cultivados en tubos con agar Sabouraud inclinado (Merck, Darmstadt, Alemania) a  $25^\circ\text{C}$  hasta su esporulación. El inóculo de esporas se preparó por lavado de la superficie del agar con solución estéril de lauril sulfato de sodio (Merck, Alemania) al 0,01% (m/v) en solución de glucosa al 1% (m/v) (Carlo Erba, Milán, Italia). Se adicionaron diez mililitros de la solución sobre el cultivo, aflojando los conidios por medio de un raspado suave con espátula estéril y se realizaron diluciones seriadas. El número de conidios se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

### **Bioensayo para la reducción de la germinación de los conidios de *Aspergillus ochraceus***

La reducción de la germinación (RG) de los conidios de *A. ochraceus* AFUNL9 y *A. ochraceus* FNSP se llevó a cabo en placas estériles y desechables de microdilución (96 pocillos) de fondo plano (Brand, Wertheim, Alemania) (Magnusson *et al.*, 2003; Lavermicocca *et al.*, 2000). La suspensión ( $10 \mu\text{l}$ ) que contenía  $10^4$  conidios  $\text{ml}^{-1}$  fue adicionada a  $190 \mu\text{l}$  de cada SLC en cada pocillo (tabla 1). Los ensayos se realizaron por octuplicado, usando como control el sustrato de panela sin fermentar (SSF) y que fue esterilizado por microfiltración al igual que los demás SLC. La RG de los conidios se determinó luego de una incubación por 48 h en una cámara húmeda a  $25^\circ\text{C}$ . Para las lecturas de la DO se empleó un lector automatizado de microplacas para test de ELISA RT-2100C (Pioway, Nanjing, China) a una longitud de onda de 492 nm (Rojas *et al.*, 2004). La actividad antifúngica de los SLC fue expresada como el

%RG medida a una  $\text{DO}_{492}$  comparada con el control. El %RG se calculó empleando la ecuación 1:

$$\%RG = [(DO_{\text{CONTROL}} - DO_{\text{SLC}}) / DO_{\text{CONTROL}}] \times 100 \quad \text{Eq.(1)}$$

Un %RG de los conidios mayor al 20% es considerada como positiva, la reducción es baja por debajo del 40%, es media entre el 40% y 70% y fuerte si es superior al 70% (Gerez *et al.*, 2009).

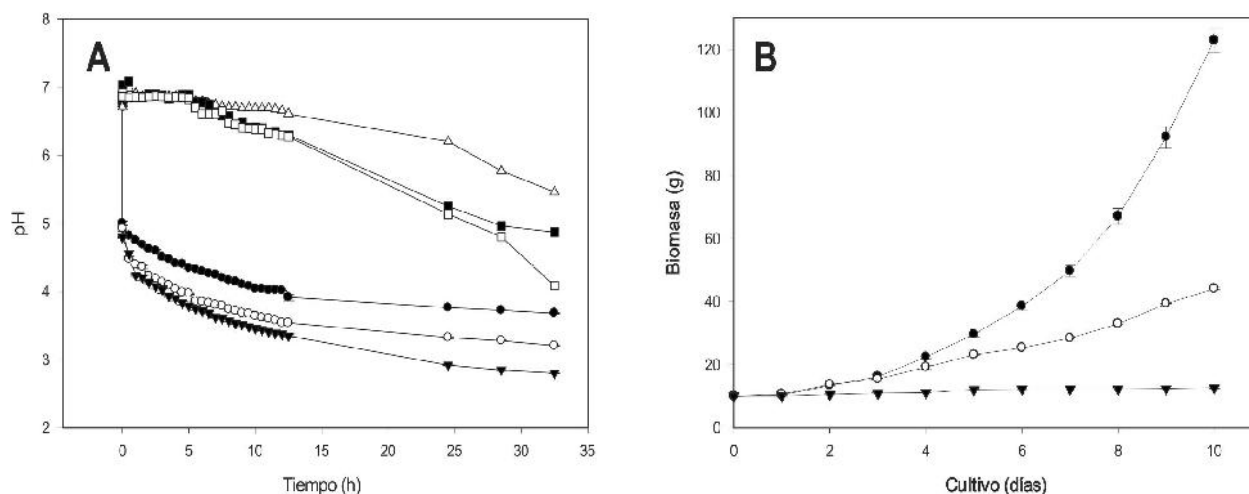
### **Preparación de los símiles**

Tres soluciones de panela ( $41,5 \text{ g L}^{-1}$ ) fueron acidificadas artificialmente por la adición de ácidos láctico y acético en las cantidades reportadas en el análisis por HPLC. Dichas concentraciones correspondieron a:  $2,1542$  y  $0,1408 \text{ g L}^{-1}$  (para simular el SLC7);  $2,1011$  y  $0,3835 \text{ g L}^{-1}$  (para simular el SLC5);  $0,6181$  y  $0,0375 \text{ g L}^{-1}$  (para simular el SLC3) de ácido láctico (Carlo-Erba, Italia) y ácido acético (Merck, Alemania), respectivamente. En otro grupo de experimentos, el pH de tres soluciones acuosas de panela ( $41,5 \text{ g L}^{-1}$ ) fue ajustado a cada uno de los siguientes pH: 3,2; 3,5 y 4,0; empleando HCl 3 M (Merck, Alemania), para simular los valores de pH encontrados en algunos tratamientos con mayor efecto inhibitorio. El pH de los sobrenadantes se determinó a  $25^\circ\text{C}$  con un analizador Orion 710A+ (Thermo Electron Corp.). Todas las soluciones de panela acidificadas artificialmente fueron centrifugadas y microfiltradas como se describió anteriormente.

## **Resultados y discusión**

### **Cinética de pH**

El pH descendió tan pronto como fueron adicionados al sustrato de panela los gránulos de KA y cómo siguió acidificándolo en el tiempo de fermentación a las tres temperaturas evaluadas ( $25$ ,  $30$  y  $37^\circ\text{C}$ ). El control permaneció a un pH constante hasta presentar un leve descenso a partir de la hora 12,5; posiblemente desarrollado por levaduras que podrían contaminar durante las repetidas lecturas de pH al insertar el electrodo en la bebida. En general se observa (figura 1A) que la curva de acidificación tiene inicialmente una pendiente más pronunciada durante las primeras horas de fermentación, donde el pH desciende con mayor velocidad. Luego la pendiente de acidificación se hace menos pronunciada, y el pH desciende con menor velocidad hasta que presenta una tendencia a permanecer en un rango de valores muy cercanos, donde posiblemente la actividad metabólica de los microorganismos y la producción de ácidos podría resultar inhibitoria en el desarrollo de algunos microorganismos (Garrote, 1999). Se determinó que la panela es un sustrato adecuado para el cultivo de los gránulos de KA. Además, se encontró que el pH descendía más rápido a medida que se aumentó la temperatura.



**Figura 1.** (A): Cinética de pH para el sustrato de panela (4,15% de panela y 10% de gránulos de KA). ●: 25 °C, ○: 30 °C, ▼: 37 °C, △: blanco 25 °C, ■: blanco 30 °C, □: blanco 37 °C. (B): Incremento de la biomasa de los gránulos de KA (10%) en solución de panela (4,15%). ●: 25 °C, ○: 30 °C, ▼: 37 °C. Las barras de error representan la desviación estándar de un triplicado.

Algunos autores han reportado la disminución del pH en sustratos azucarados para que sean fermentados por el consorcio de microorganismos embebidos en el gránulo de KA. Silva *et al.* (2009) emplearon 10 g L<sup>-1</sup> de diferentes azúcares sin refinar (demerara, morena y melaza) como sustrato de fermentación para el KA (inóculo del 0,6%), en los cuales analizaron el descenso del pH durante un periodo de 7 días, ajustando el pH inicial a 5 con HCl 0,1M. Estos autores determinaron el mínimo pH de 3,3 para el azúcar demerara, 3,4 para el azúcar morena y de 3,5 para la melaza, luego de 48 h de incubación a 25 °C. En esta investigación se encontraron niveles mínimos de pH de 3,7 en periodos más cortos de tiempo (32,5 h) a 25 °C y en los que se empleó panela como sustrato inoculado con 10% de gránulo de KA, lo que permite concluir que la panela es un medio adecuado para el cultivo de los gránulos de KA.

Usando kéfir de leche, Garrote (1999) reportó un descenso del pH luego de 48 h hasta un nivel de 4,5 cuando inoculó la leche con 1% de kéfir. En esta investigación, al emplear niveles de 1% de KA en el sustrato acuoso de panela, se logró obtener a las 32,5 horas de fermentación valores de pH de 4,3 y 4,2 (dato no mostrado) cuando dicha fermentación se hizo a 25 °C, e inclusive siendo inferiores estos niveles de pH cuando la fermentación se realizó a temperaturas más elevadas (30 y 37 °C). La mayor capacidad de descenso de pH del KA en comparación al kéfir de leche, puede deberse a la falta de proteínas, calcio y fosfatos en el sustrato de panela, que pueden actuar como sistemas buffer en una matriz alimenticia como la leche (Edward & Herod, 1994).

La disminución del pH es importante porque es un indicador de la acidificación debido a la conversión de carbohidratos a productos derivados del proceso

fermentativo. Estos productos metabólicos son importantes a su vez, ya que su presencia puede ser considerada como uno de los medios principales y efectivos para la inhibición de microorganismos patógenos, por lo que se cuantificaron en este estudio.

### Relación de microorganismos viables

Tal como se observa en la tabla 2 se encontró que las BAL tuvieron su máximo recuento a 25 y 30 °C; las levaduras estuvieron constantes y las BAA tuvieron sus mayores recuentos a 25 y 37 °C. En las fermentaciones realizadas a 25 y 30 °C se observó que las BAL fueron el grupo dominante. A diferencia de 37 °C donde hubo un incremento de las levaduras y una disminución de las BAA mostrando una reorganización diferente. Anteriormente se ha afirmado que la proporción de levaduras en el gránulo de KA representa de 2 a 5% de la flora total (Hallé *et al.*, 1994), pero a esta temperatura, la proporción de los microorganismos cambió completamente, lo que podría traer consecuencias para la fermentación de la bebida porque se podría incrementar su contenido alcohólico. Además, la disminución de las BAL puede tener un efecto negativo en la producción del polisacárido que conforma el gránulo de KA. El reordenamiento en la relación de microorganismos de la bebida fermentada por los gránulos de KA a una temperatura de 37 °C, también podría ser atribuido a que, a esta temperatura se desencadenó una mayor actividad metabólica, en la cual hubo un mayor consumo de componentes metabolizables proveniente de la bebida de panela, y posteriormente un agotamiento de nutrientes consumidos por los microorganismos fermentadores, lo que a su vez se pudo traducir en muerte microbiológica y/o la pérdida de la capacidad de crecimiento microbiano. Esto pudo ser evidenciado

**Tabla 2.** Promedio del recuento de los microorganismos viables en el KA. UFC: unidades formadoras de colonias; BAL: Bacterias ácido lácticas; BAA: Bacterias ácido acéticas; Sci: Sustrato con inóculo; Ssi: Sustrato sin inóculo; ND: No detectable;  $\pm$ : desviación estándar. Ensayos realizados por duplicado

Temperatura de fermentación		BAL		Levaduras		BAA	
		(UFC ml <sup>-1</sup> )	%	(UFC ml <sup>-1</sup> )	%	(UFC ml <sup>-1</sup> )	%
25 °C	Sci	6 $\pm$ 0,1x10 <sup>7</sup>	93,7	1 $\pm$ 0,6x10 <sup>6</sup>	1,56	3 $\pm$ 0,3x10 <sup>6</sup>	4,68
	Ssi	ND	-	ND	-	ND	-
30 °C	Sci	4 $\pm$ 0,1x10 <sup>7</sup>	97,0	1 $\pm$ 0,3x10 <sup>6</sup>	2,40	5 $\pm$ 0,3x 10 <sup>5</sup>	1,2
	Ssi	ND	-	ND	-	ND	-
37 °C	Sci	1 $\pm$ 0,09x10 <sup>6</sup>	25	2 $\pm$ 0,1x10 <sup>6</sup>	50,0	1 $\pm$ 0,3x 10 <sup>6</sup>	25
	Ssi	ND	-	ND	-	ND	-
Blanco	-	ND	-	ND	-	ND	-

en primer lugar con una mayor producción de ácidos orgánicos y un mayor descenso del pH, y en segundo lugar en el recuento de la flora total de cada uno de los fermentos. A 25 °C se cuantificó un total de 6,4x10<sup>7</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de microorganismos viables totales (suma de todas las bacterias y levaduras), mientras que a 30 y a 37 °C se cuantificaron cantidades inferiores, correspondientes a 4x10<sup>7</sup> y 4x10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos resultados muestran que la temperatura de fermentación juega un rol crucial en la relación simbiótica de los microorganismos que componen el gránulo de KA. La disminución de la cantidad de microorganismos podría jugar un rol muy importante en el mantenimiento del peso a través de repiques sucesivos del gránulo (Garrote, 1999). Algunos investigadores también han reportado el contenido de microorganismos de bebidas azucaradas fermentadas con gránulos de kéfir. Teixeira *et al.* (2010) fermentaron una solución al 5% de azúcar morena con gránulos de kéfir (10% aprox.) y luego de una fermentación por 24 h a 25 °C obtuvieron una relación de microorganismos en la bebida fermentada de 57,6% de BAL, seguido por las levaduras con un 30,9% y las BAA con un 11,5%. En ese ensayo como el reportado en ésta investigación, las BAL representaron el grupo dominante, pero se observa una relación diferente de cada porcentaje de microorganismos, siendo valores inferiores de BAL, si se lo compara con nuestros resultados (94%), obtenidos cuando la bebida de panela se fermentó a la misma temperatura (25 °C). Igualmente se observa que la cantidad de levaduras y BAA, es mayor a la encontrada en este estudio en la bebida fermentada bajo idénticas condiciones. Esta diferencia en la relación de microorganismos, se podría fundamentar en el origen y las condiciones de fermentación de los gránulos, pudiendo esto ser un factor determinante (Garrote, 1999). Sin embargo, se observa que hay un predominio de las BAL con respecto a los demás microorganismos cuantificados.

Los resultados obtenidos a las temperaturas de fermentación de 25 y 30 °C, concuerdan con los reporta-

dos por Simova (2002) y Teixeira *et al.* (2010), quienes identificaron que las BAL eran el grupo de microorganismos dominante y más numeroso en el gránulo de kéfir de leche y kéfir de agua, respectivamente. Lo anterior indica que los microorganismos que se encontraban en un alto recuento en la matriz del polisacárido, pasaron a la bebida, debido posiblemente a su poca adherencia al gránulo (Jianzhong *et al.*, 2009).

### Producción de biomasa

En la figura 1B se observa la tasa de crecimiento de la biomasa expresada en gramos. Se demostró que la temperatura de incubación tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) luego del cultivo por 10 días, obteniendo a 25 °C los mayores incrementos (123  $\pm$  3,7 g). A 30 °C se obtuvo un peso promedio final de 44  $\pm$  0,4 g. A 37 °C se obtuvo el menor incremento en la biomasa, con un peso promedio final de 13  $\pm$  0,3 g, aumentando su biomasa luego de 10 días en tan solo 3 g, por lo que es posible afirmar que ésta no fue una temperatura óptima para la producción de biomasa de los gránulos. El gránulo de KA es capaz de fermentar durante años sustratos relativamente pobres en nitrógeno (Hallé *et al.*, 1994), como resultó ser la panela cuando se analizó este parámetro en nuestro laboratorio (dato no mostrado). Por lo general, el azúcar disponible en los sustratos de fermentación habituales es la sacarosa, pero algunos microorganismos del gránulo son incapaces de metabolizarlo o lo hacen muy lentamente. En este sentido, las levaduras se benefician del metabolismo de las bacterias ya que muchas de ellas poseen las enzimas específicas para desdoblar este disacárido; y a su vez, las bacterias se benefician de las vitaminas y aminoácidos producidos por las levaduras y liberados luego de su lisis celular (Hallé *et al.*, 1994). Diniz *et al.* (2003), realizaron una curva de incremento de la biomasa de gránulos de KA (5 g) cultivándolos en un sustrato compuesto de melaza (50 g L<sup>-1</sup>) a 25 °C, obteniendo luego de 10 días de incubación alrededor de



41 g, es decir, 88% de incremento de biomasa (%IB). En los experimentos realizados a 25 °C se obtuvo 92% de IB, demostrando la eficacia de nuestros gránulos y del sustrato de panela empleado para la fermentación. Estos resultados contrastan cuando se comparan con el kéfir de leche, y en el que se ha reportado que la más alta producción de biomasa se ha logrado cuando se realiza la fermentación a 37 °C, en vez de una temperatura de 25 °C (Zajšej & Goršek, 2011).

Los factores que afectan el incremento de la biomasa del gránulo de KA han sido poco estudiados, pero al contrastar con los resultados previamente obtenidos con el kéfir de leche, se podría asumir que si se mantiene en alto número la relación de BAL-LEV, presentes en la matriz del gránulo, se logra un buen incremento de la biomasa (Guzel-Seydi *et al.*, 2011).

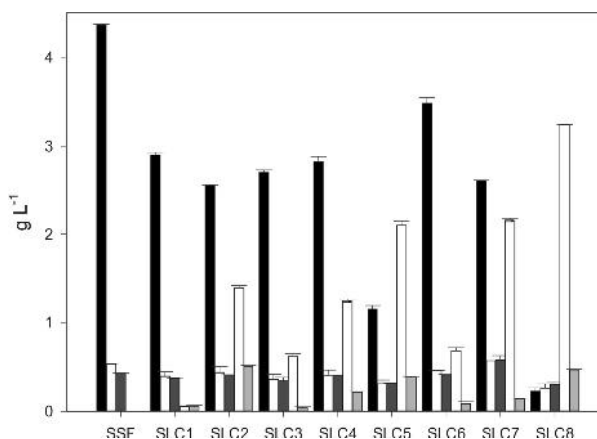
Estos resultados corroboran que la producción del polisacárido compuesto de dextrano que conforma el gránulo de KA, es mediada por las BAL, siendo ésta una de las tareas principales y más importantes para su mantenimiento (Pidoux, 1989). Los geles de dextrano tienen la habilidad de inmovilizar microorganismos y se pueden producir empleando para ello sustratos económicos que contenga azúcares (Pidoux *et al.*, 1992), como lo es la panela.

### Metabolismo de carbohidratos

La sacarosa, glucosa y fructosa fueron analizadas en los SLC mediante HPLC. La sacarosa disminuyó con respecto al control (SSF) en todos los sobrenadantes examinados (figura 2). La glucosa y la fructosa no aumentan significativamente, debido posiblemente a su utilización en los procesos metabólicos de los microorganismos del gránulo de KA para producir ácido láctico principalmente. En el SLC8 (pH: 2,8; temperatura de obtención: 37 °C) se obtuvo la mayor disminución de la concentración inicial de sacarosa, aproximadamente en un 95%, seguido del SLC5 (pH: 3,2; temperatura de obtención: 30 °C) (74%) y el SLC2 (pH: 3,6; temperatura de obtención: 25 °C) (42%). Estos tres sobrenadantes tuvieron un tiempo de fermentación superior al resto de sobrenadantes empleados (tabla 1), y ese mayor tiempo de contacto entre los gránulos y el sustrato, puede explicar la mayor hidrólisis de la sacarosa y su posterior asimilación para la mayor producción de AO y demás productos del metabolismo de los microorganismos presentes. También se pudo emplear parte de la sacarosa para la formación del exopolisacárido (EPS) mediante enzimas dextranucrasas (Salminen *et al.*, 2004).

### Análisis de ácidos orgánicos

Con el fin de determinar si las diferencias en la inhibición fúngica se deben a las variaciones en la producción de los AO, los SLC se analizaron por HPLC y se determinó la cantidad de los ácidos láctico y acético.



**Figura 2.** Cuantificación de carbohidratos y ácidos orgánicos en el sustrato sin fermentar (SSF) y los sobrenadantes libres de células (SLC). Las barras de error representan la desviación estándar de un duplicado. Barra negra: Sacarosa, Barra blanca: Glucosa, Barra gris: Fructosa, Barra Zig-Zag blanca: Ácido Láctico, Barra Zig-Zag gris: Ácido Acético.

Se observa (figura 2) que las cantidades de ácido láctico son superiores a las del ácido acético en todos los sobrenadantes obtenidos, posiblemente porque las BAL homofermentativas son más numerosas que las heterofermentativas y que las BAA (Teixeira *et al.*, 2010); y que la cantidad de ácido láctico producido aumentó con el tiempo de incubación y la temperatura. Ninguno de estos AO se pudo cuantificar en el control (SSF). Pocos reportes han sido encontrados acerca de la cantidad de AO producidos por la fermentación de sustratos azucarados por gránulos de KA. En 2010, Teixeira *et al.*, evaluaron los AO (láctico y acético) en una bebida hecha con azúcar morena (5% m/v) fermentada con gránulos de KA (11% m/v) por un periodo de 24 h a temperatura ambiente (25 °C), encontrando cantidades de 19,42 mmol L<sup>-1</sup> de ácido láctico (aproximadamente) y 23,31 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético. En nuestras fermentaciones realizadas también a 25 °C, pero durante un periodo de tiempo de aproximadamente 8 h más, la concentración de ácido láctico es un poco inferior, siendo de 15,5 mmol L<sup>-1</sup>. Así mismo, la concentración de ácido acético es casi dos veces menor, en un valor de 8,4 mmol L<sup>-1</sup>. A diferencia de lo reportado por Teixeira *et al.* (2010), en todas nuestras fermentaciones, la concentración de ácido acético siempre fue inferior a la del ácido láctico. Esta diferencia puede ser debida a la cantidad y relación de microorganismos que conforman el gránulo. En nuestro caso a 25 °C la cantidad de BAL, levaduras y BAA correspondió a 93,75%, 1,56% y 4,68%, respectivamente. Y aunque en el estudio anteriormente citado, las BAL eran el grupo dominante con un 57,65%, la relación de los microorganismos era diferente, correspondiente a 30,86% de levaduras y un 11,48% de

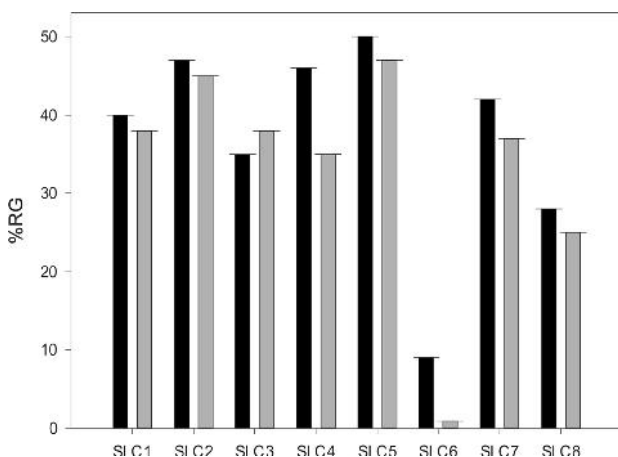


BAA. Estas diferencias en las cantidades de microorganismos, además del efecto que pudo tener la temperatura, pudieron derivar en las diferentes proporciones de AO encontradas en las bebidas fermentadas por los gránulos de KA.

Los microorganismos que componen el gránulo de KA produjeron la hidrólisis de la sacarosa, para ser metabolizada junto con la glucosa y la fructosa que fueron convertidos en otras sustancias que podrían tener implicaciones importantes en la inhibición de microorganismos patógenos o contaminantes de alimentos.

### Bioensayo

A las 48 h de incubación a 25 °C la mayoría de los sobrenadantes presentaron efecto antifúngico debido a que produjeron un %RG superior al 20% (figura 3). El SLC5 (pH: 3,2; temperatura de obtención: 30 °C) produjo el mayor %RG, del 50 y 47% para *A. ochraceus* AFUNL9 y *A. ochraceus* FNSP, respectivamente. La única excepción la presentó el SLC6 (pH: 4,0; temperatura de obtención 37 °C), que en ambas cepas de *A. ochraceus* no logró disminuir su germinación. Esta incapacidad se podría vincular al hecho de que este sobrenadante contenía altos índices de carbohidratos no asimilados durante el periodo fermentativo presentando el más alto contenido de sacarosa (3,5 g L<sup>-1</sup>), solo superado por el control (4,4 g L<sup>-1</sup>), además de altas cantidades de glucosa y fructosa (ver figura 2). Estos carbohidratos disponibles pudieron desencadenar una germinación más acelerada y similar a la del control. Los niveles de %RG de los conidios de ambas cepas de *A. ochraceus* a las 48 h de incubación tuvieron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Por lo que cada sobrenadante que fue obtenido



**Figura 3.** Porcentaje de reducción de la germinación (%RG) de los conidios de *A. ochraceus* AFUNL9 y FNSP con los SLC (ver tabla 1). Las barras de error representan la desviación estándar de un octuplicado. Barra negra: *A. ochraceus* AFUNL9, Barra blanca: *A. ochraceus* FNSP.

a diferentes temperaturas, muestra una faceta única en la inhibición presentada y donde las concentraciones de AO pudieron jugar un rol fundamental en la inhibición. Cada uno de los sobrenadantes contenía cantidades diferentes de AO producidos y demás productos metabólicos generados durante la fermentación. Esta particularidad hizo que cada sobrenadante produjera resultados claramente distintos en el %RG, con lo que se demuestra que el tiempo y la temperatura de fermentación fueron factores determinantes para la mayor o menor inhibición mostrada sobre ambas cepas de *A. ochraceus*. Se esperaba que los sobrenadantes con un mayor poder antifúngico fueran aquellos fermentados a la más alta temperatura (37 °C), donde hubo mayor cantidad de AO (láctico y acético), tal y como puede apreciarse en el SLC8 (pH: 2,8; obtenido a 37 °C) (figura 2), que cumple dos características (bajo pH y mayor cantidad de AO), y aún así éste no sobresalió en la RG de los conidios de *A. ochraceus*. Indicando con estos resultados que pueden existir compuestos no relacionados con el pH o con la mayor producción de AO, además de los que fueron cuantificados (láctico y acético), y que pudieron también reducir la germinación de ambas cepas de *A. ochraceus* a las 48 h de incubación.

### Efecto de los ácidos orgánicos

Para evaluar si los AO láctico y acético fueron en gran medida, los agentes responsables de los efectos inhibitorios, se prepararon símiles de los SLC7 (pH: 3,5; obtenido a 37 °C), SLC5 (pH: 3,2; obtenido a 30 °C) y SLC3 (pH: 4,0; obtenido a 30 °C) adicionando los ácidos en las mismas concentraciones a las encontradas en los sobrenadantes provenientes de las fermentaciones. Los símiles de los tres sobrenadantes actuaron de forma similar a los SLC sobre ambas cepas de *A. ochraceus*, alcanzando el mayor %RG con el símil del SLC7 (48 ± 0,005 % sobre *A. ochraceus* AFUNL9 y 47 ± 0,004 % sobre *A. ochraceus* FNSP). De estos tres sobrenadantes (y sus símiles) el SLC3 contenía la menor cantidad de AO y consecuentemente fue el que produjo el menor %RG de ambas cepas de *A. ochraceus*. Podríamos asumir que los AO jugaron un papel fundamental en la inhibición fúngica, ya que los símiles de los SLC redujeron la germinación de los conidios de *A. ochraceus* de ambas cepas. Como es conocido, la forma no disociada de los AO es la principal causa de su poder inhibitorio (Garrote et al., 2000). La capacidad de estos ácidos para reducir el pH del medio y el carácter lipofílico de su forma protonada (no disociado), facilita su incursión a través de la membrana celular (Bogaert & Naidu, 2000).

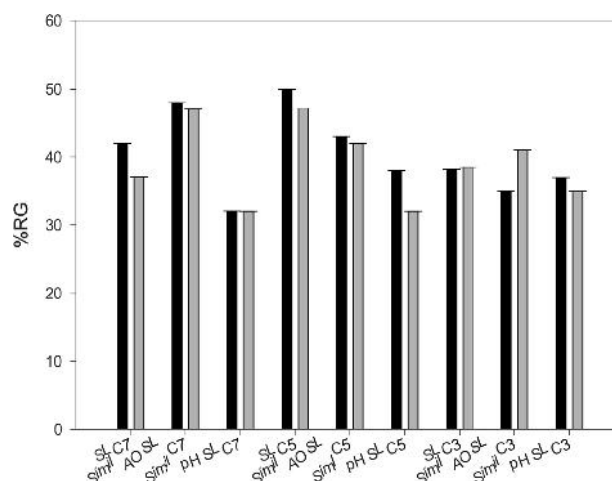
### Efecto del pH

Para analizar la influencia que pudo tener el pH en el %RG de los conidios de *A. ochraceus* de ambas cepas, se acidificó artificialmente el sustrato acuoso de panela

con HCl 3 M hasta alcanzar los tres pH de los SLC7 (pH: 3,5), SLC5 (pH: 3,2) y SLC3 (pH: 4,0). Los símiles de pH tuvieron efecto inhibitorio, aunque fueron significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) a los obtenidos con los sobrenadantes fermentados con gránulo de KA (figura 4). Se podría asumir que además del pH intervinieron otras sustancias inhibitorias en el %RG del hongo. En contraste con estos resultados, Garrote et al. (2000) reportaron no haber encontrado que el pH tuviera algún efecto inhibitorio *per se*, cuando acidificaron leche con HCl para inhibir *Escherichia coli*. Pero, cuando agregaron al medio, ya sea, ácido láctico y/o ácido acético encontraron un efecto inhibitorio. En los resultados, las soluciones acuosas de panela artificialmente acidificadas con un ácido inorgánico (HCl 3 M) tuvieron efecto inhibitorio, sin necesidad de la presencia en el medio de AO (ácido láctico y/o ácido acético), aunque fue inferior. Se podría asumir que existe una acción antimicrobiana debida a la reducción del pH extracelular. Y, aunque se considera que los ácidos fuertes del tipo monoprótico, como el HCl no poseen acción antimicrobiana, como si lo tienen los AO (Bogaert & Naidu, 2000); se ha descrito que el efecto que tiene el pH, depende en gran medida de otros factores, como pueden ser el tipo de sustrato, la incubación, la temperatura, la cepa del moho, entre otras (Gourama & Bullerman, 1995).

#### Efecto de la ebullición de los sobrenadantes libres de células

Los SLC3, SLC5 y SLC7 se sometieron a ebullición durante 5 minutos antes de realizar la prueba de %RG. El SLC3 (pH: 3,5; obtenido a 25 °C) conservó la misma acción inhibitoria que tuvo sin ebullición; el SLC5 (pH: 3,2; obtenido a 30 °C) disminuyó significativamente y el SLC7 (pH: 3,5 perdió su actividad antifúngica (figura 5). Posiblemente los productos formados durante el tiempo de fermentación poseían una naturaleza

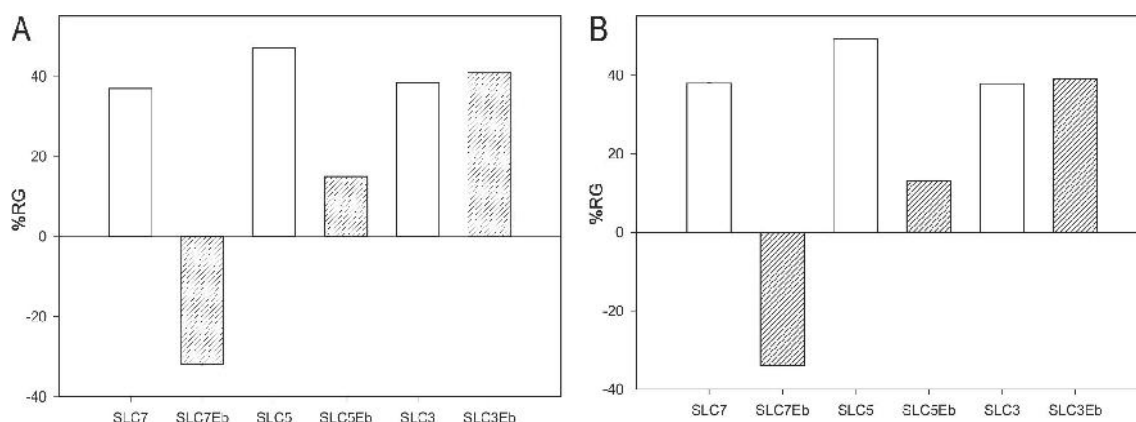


**Figura 4.** Comparación de los sobrenadantes libres de células (SLC) Vs. los símiles de ácidos orgánicos (AO) y pH. Las barras de error representan la desviación estándar de un octuplicado. Barra negra: *A. ochraceus* AFUNL9, Barra blanca: *A. ochraceus* FNPS.

termolábil ya que probablemente fueron destruidos, volatilizados o desnaturalizados durante éste proceso. Powell et al. (2007) reportaron una bacteriocina producida por *Lb. plantarum* ST8KF aislada de kéfir de leche, la cual permaneció activa luego de ser sometida a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos. Lo anterior permite inferir que aún los compuestos de tipo proteico como las bacteriocinas pueden soportar temperaturas elevadas, manteniendo su actividad inhibitoria sin desnaturalizarse.

#### Conclusiones

En este estudio se investigó la actividad fermentativa del KA en un sustrato económico y de fácil adquisición



**Figura 5.** Comparación de la reducción de la germinación (RG) de (A) *A. ochraceus* AFUNL9 y (B) *A. ochraceus* FNPS luego de 48 h de incubación a 25 °C entre los sobrenadantes libres de células 7 (SLC7) (pH: 3,5), SLC5 (pH: 3,2) y SLC3 (pH: 4,0); y los SLC ebullicidos (SLC Eb) por 5 min. Las barras de error representan la desviación estándar de un octuplicado.

y preparación como lo es la panela. Se determinó que el gránulo inoculado en este sustrato y bajo diferentes condiciones de incubación, fermentaba hasta alcanzar pH mínimos de 2,8, conservaba el recuento de los grupos microbianos de BAL, levaduras y BAA y que conservaba la capacidad de producir biomasa. Adicionalmente, los SLC obtenidos del sustrato fermentado con gránulos de KA, demostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de *A. ochraceus*, constituyéndose en una alternativa de biopreservación de matrices alimentarias.

Dicha actividad antifúngica se atribuyó principalmente a la combinación del descenso del pH y los AO producidos durante la fermentación del sustrato, especialmente el láctico y el acético. No obstante, dado el carácter complejo de la comunidad microbiana del gránulo de kéfir, será necesario identificar la presencia de otros compuestos con actividad antifúngica en los SLC.

## Referencias

- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G., Schwan, R. F., Wheals, A. E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Int J Food Microbiol.* 85 (3), 293-300.
- Bogaert, J. C., Naidu, A. S. (2000). *Natural Food Antimicrobial Systems*, Boca Raton, Florida (USA): CRC Press, p 800.
- Diniz, R. O., Garla, L. K., Scheneedorf, J. M., Carvalho, J. C. T. (2003). Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacol Res.* 47(1), 49-52.
- Edward, L., Herod, M. S. D. D. S. (1994). The use of milk as a saliva substitute. *J Public Health Dent.* 54(3), 184-189.
- Frank, J. M. (1999). HACCP and its mycotoxin control potential: Ochratoxin A (OTA) in coffee production. *Proc. 7<sup>th</sup> International Committee Food Microbiology Hygiene*. The Netherlands, Veldhoven. pp. 1222-1225.
- Gamba, R.R., Ni Colo, C., Correa, M., Astoreca, A., Alconada, T., De Antoni, G., León-Peláez, A.M. (2015). Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kéfir grains. *Sci Res.* 5(6), 479-492.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kéfir grains. *J Dairy Res.* 68(4), 639-452.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2000). Inhibitory power of kéfir: The role of the organic acids. *J food protect.* 63(3), 364-369.
- Garrote, G. L. (1999). *Bacterias Lácticas y Levaduras para la Industria Alimentaria: Kéfir*. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias exactas, Departamento de Química y Ciencias Biológicas. p 168.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control.* 20(2), 144-148.
- Gourama, H., Bullerman, L. B. (1995). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J Food Protect.* 11(8), 1249-1256.
- Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Ertekin-Filiz, B., Seydim, A. C. (2011). Effect of different growth conditions on biomass increase in kéfir grains. *J Dairy Sci.* 94(3), 1239-1242.
- Hallé, C., Leroi, F., Dousset, X., Pidoux, M. (1994). Les kefirs des associations bactéries lactiques – En : de Roissart, H., Luquet, F.M., (Editores.), *Bactéries Lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques*. France: Loriga, p169-182.
- Hunter, D., Segel, I. H. (1973). Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*. Evidence for a proton or charge gradients as the driving force. *J Bacteriol.* 113(3): 184-1192.
- Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 26(8), 770-775.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol.* 66(9), 4084-4090.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol let.* 219(1), 129-135.
- Martins, M. L., Martins, H. M., Gimeno, A. (2003). Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*coffee Arabica*). *Food Addit Contam.* 20(12), 1127-1131.
- Ministerio de la Protección Social (INVIMA). Resolución 000779. (2006). *Reglamento técnico sobre requisitos sanitarios en la producción y comercialización de la panela para consumo humano*. República de Colombia. p 19.
- Miao, J., Guo, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., Ke, C., Chen, Y., Zhao, L., Cao, Y. (2014). Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocine produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control.*
- Moinas, M., Horisberge, M., Bauer, H. (1980). The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Arch Microbiol.* 128(2), 157-161.
- O'Callaghan, J., Stapleton, P. C., Dobson, A. D. W. (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by a pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet Biol.* 43(4), 213-221.
- Pidoux, M. (1989). The microflora of sugary kefir grain (the ginger-beer plant): Biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal.* 5(2), 223-238.
- Pidoux, M., Pilet, M. F., Ripoche, V. (1992). Growth performances of *Lactobacillus hilgardii* immobilized in dextran gel and in continuous fermentation. *World J Microb Biot.* 8(4), 393-398.
- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolated *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int Dairy J.* 17(3), 190-198.
- Rojas, O. C., Vivas, J. J., Guerrero, A. J. (2004). Estandarización del inóculo de *Cladiophialophora carrionii* por el método espectrofotométrico para estudios de sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos. *Rev Soc Ven microbial.* 24(1/2), 89-94.
- Scudamore, K. A., Banks, J., McDonald, K. J. (2003). Fate of Ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Addit Contam.* 20(12), 1153-1163.
- Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. New York: Marcel Dekker, p 798.

- Salmond, C. V., Kroll, R. G., Booth, I. R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 130(11), 2845-2850.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Appl Biochem Biotech*, 152(2), 316-325.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002). Lactic Acid Bacteria and yeast in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biot*, 28(1), 1-6.
- Soriano del Castillo, J. M. *Micotoxinas en alimentos*. (2007). España: Ediciones Díaz de Santos, p 396.
- Suárez-Quiroz, M., Gozález-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J. P. (2004). Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiol*, 21(6), 629-634.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Lamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol*, 82(2), 173-179.
- Teixeira, K. M., Pereira, G., Dias, D., Schwan, R. (2010). Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microb Biot*, 26(7), 1241-1250.
- Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leita, M. F., Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. *J Food Protect*, 64(8), 1226-1230.
- Waldherr, F., Doll, V. K., Meißner, D., Vogel, R. F. (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from a *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiol*, 27(5), 672-678.
- Zajšek, K., Goršek, A. (2011). Experimental assessment of the impact of cultivation conditions on kefir production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. *Chem Eng Trans*, 24, 481-486.



# Caracterización bioquímica de hojas de clones de *Theobroma cacao* y su relación con los tricomas

## Biochemical characterization of leaves in *Theobroma cacao* clones and its relation with trichomes

Janet Quiñones-Galvez<sup>\*1</sup>, Daynet Sosa<sup>\*\*1,2</sup>, JR. Demey<sup>\*\*\*</sup>, Silvia Alemán<sup>\*\*\*\*</sup>, Maryla Sosa<sup>\*\*\*\*</sup>; Dercy Parra<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Olga Móvil<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Reinaldo Trujillo<sup>\*</sup>, Yanelis Capdesuñer<sup>\*</sup>, Yemeys Quirós<sup>\*</sup>, Martha Hernández<sup>\*3</sup>, Diógenes Infante<sup>\*\*\*\*\*3</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54265

### Resumen

*Theobroma cacao* L. es un cultivo de gran importancia por sus posibles aplicaciones en la farmacia y la agricultura. Contiene metabolitos que resultan de gran interés por sus funciones biológicas naturales en la respuesta de la planta a los diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. La presencia, tipo y concentración de los metabolitos (primarios y secundarios) pueden variar de acuerdo al genotipo analizado y se pueden acumular en estructuras asociadas a la arquitectura de la hoja como son los tricomas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar 26 clones del banco de germoplasma de Padrón, INIA-Miranda, Estado Miranda, Venezuela y estudiar la relación existente entre los indicadores bioquímicos y el número de tricomas. Se determinó el contenido de compuestos fenólicos, proteínas solubles, prolina libre, carbohidratos totales, ligninas, el número de tricomas y la relación existente entre ellos. Los resultados mostraron que en el espacio bidimensional que explica el 46,68% de la variabilidad total, se definieron cinco grupos homogéneos: diez clones se asociaron con el máximo gradiente de prolina, carbohidratos totales y contenido de ligninas, nueve con alto contenido de proteínas y fenoles y siete con mayor número de tricomas en hojas. Se comprobó que el número de tricomas no se relacionó con la concentración de compuestos fenólicos. Los clones de cacao del tipo forastero mostraron mayor concentración de fenoles totales y carbohidratos, en tanto que los trinitarios presentaron mayor concentración de proteínas y prolina.

**Key words:** análisis de componentes principales; fenoles; prolina; proteínas; carbohidratos.

### Abstract

*Theobroma cacao* L. is a crop of major importance for their potential applications in pharmacy and agriculture. It contains metabolites that are of great interest for its natural biological functions in plant response to different types of stress, both biotic and abiotic. The presence, type and concentration of both primary and secondary metabolites may vary depending on the genotype analyzed and these compounds can accumulate in the architecture associated structures such as leaf trichomes. The aim of this study was to characterize 26 clones of the germplasm bank of Padrón, INIA-Miranda, Miranda

\* MSc. Janet Quiñones-Galvez, Dra. Martha Hernández, Dr. Reinaldo Trujillo, MSc. Yanelis Capdesuñer, Ing. Yemeys Quirós, Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba. Email: jquinones@bioplantitas.cu, janet.quinonesgalvez@gmail.com.

\*\* Dra. Daynet Sosa, Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle Sartenejas. Baruta. Caracas, Estado Miranda, Venezuela. Universidad Estatal de Milagro, UNEMI, Milagro; Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil; Guayas, Ecuador (Dirección actual).

\*\*\* Dr. JR. Demey, Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle Sartenejas. Baruta. Caracas, Estado Miranda, Venezuela. Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Guayaquil, Ecuador (Dirección actual).

\*\*\*\* MSc. Silvia Alemán, MSc. Maryla Sosa. Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

\*\*\*\*\* MSc. Dercy Parra, MSc. Olga Móvil. Estación Experimental de Padrón, INIA-Miranda, Caucagua, Estado Miranda, Venezuela.

\*\*\*\*\* Dr. Diógenes Infante, Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle Sartenejas. Baruta. Caracas, Estado Miranda, Venezuela.

<sup>1</sup> Ambas autoras tuvieron igual porcentaje de participación, por lo que se consideran autores principales.

<sup>2</sup> Codirectora del proyecto de investigación

<sup>3</sup> Directores del proyecto de investigación

State, Venezuela and study the relationship between biochemical indicators assessed and the number of trichomes. The content of phenolic compounds, soluble protein, free proline, total carbohydrates, lignins, the number of trichomes and the relationship between all traits was determined. The results showed that in the two dimensional space explained 46.68% of the variability, five homogeneous groups were defined: 10 clones were associated with the maximum gradient of proline, total carbohydrate and lignin content. Nine clones were associated with high content of phenols and a group of seven clones with the highest number of trichomes on leaves. It was found that the number of trichomes was not related to the concentration of phenolic compounds. The clones of Forastero cocoa type showed higher concentration of total phenols and carbohydrates, meanwhile the Trinitario type presented higher concentration of proteins and proline.

**Key words:** principal components analysis; phenols; proline; proteins; carbohydrates.

**Recibido:** febrero 18 de 2015

**Aprobado:** septiembre 18 de 2015

## Introducción

Los metabolitos son los responsables de muchos fenómenos y funciones indispensables para el crecimiento y desarrollo de plantas, así como de su interacción con el medio ambiente que las rodea. Dentro de ellos, se encuentran compuestos de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas como fenoles, proteínas, prolina y carbohidratos (Petti y Scully, 2009; Yoo Yongweh et al., 2012; Mulekar y Huq, 2014; Van den Ende, 2014).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de naturaleza compleja en las plantas, se relacionan con los procesos de maduración, mecanismos de defensa, respuesta a estrés biótico y abiótico, y a su vez tienen gran influencia en las propiedades organolépticas de los productos alimenticios derivados de plantas (Kubo y Matsumoto, 1984; Cimato et al., 1990; Niemenak et al., 2006). Mientras que las proteínas, la prolina y los carbohidratos son metabolitos primarios que pueden estar involucrados, al igual que los fenoles, en mecanismos de resistencia a estrés biótico y abiótico, como es el caso de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Martínez-Esteso et al., 2009), la prolina que se relaciona con la respuesta a sequía en algunas plantas (Wagner et al., 2003), los carbohidratos de la superficie de la hoja tienen un papel importante en la colonización temprana y crecimiento de hongos, así como la sacarosa favorece la formación de biopelículas de bacterias en medio de cultivo (Lindow y Brandl, 2003; Tomihama et al., 2006).

El *Theobroma cacao* L. (*T. cacao* L.) se cultiva a lo largo de las zonas tropicales del planeta (Elwers et al., 2009) aunque es una planta nativa de la región tropical de las Américas (Rusconi y Conti, 2010). Se utiliza en la medicina popular como antiséptico, diurético y parasiticida (Edwards et al., 2005) y tales propiedades se asocian a los variados metabolitos que contiene. Los mismos pueden encontrarse en diferentes órganos de la planta (hojas, tallos, raíces, flores, semillas, tricomas) de acuerdo a su ruta biosintética y su función biológica (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Actualmente existen estudios encaminados al análisis de la calidad y sabor del chocolate por la caracterización de los cambios en la composición de

proteínas y fenoles durante la maduración de los frutos de cacao, la fermentación de las semillas y pasos claves en la producción industrial del chocolate (Pirovani et al., 2008; Guehi et al., 2010; Afoakwa et al., 2012a; Afoakwa et al., 2012b).

Las plantas con mayores concentraciones de proteínas revisten gran interés debido a su importancia para el desarrollo de las plantas, así como para el beneficio humano. Mientras que los fenoles se conocen también por su beneficio a la salud humana y se les han encontrado diversas actividades, entre las que se encuentran: moduladores de la absorción de grasas, anti-inflamatorios, en la reducción de enfermedades cardiovasculares al reducir la síntesis de lípidos y como antioxidantes (Guerrero et al., 2013; Gu et al., 2014; Sarria et al., 2014). Por otra parte se les conoce por su actividad antimicrobiana contra patógenos que afectan a las plantas y al hombre (Godard et al., 2009; Li et al., 2009; Vivot et al., 2009; Mishra et al., 2010; Pandey y Mishra 2010).

La superficie de hojas de la mayoría de las plantas está cubierta por células modificadas de la epidermis que se denominan tricomas (Peter y Shanower, 1998). Los compuestos que se encuentran en los tricomas de la superficie foliar, pueden estar involucrados fundamentalmente en la defensa a diferentes condiciones de iluminación y ataque de patógenos e insectos (Wagner, 1991; Peter y Shanower, 1998; Wagner et al., 2004; Ishida et al., 2008). En plantas de cacao, se encontró que los tricomas glandulares pueden proveer el punto de entrada de especies de *Tricoderma* en el tallo, contribuyendo a una colonización sistémica del tejido y al establecimiento de una asociación endofítica (Bailey et al., 2009).

Por todo lo anterior, y hasta donde tenemos conocimiento, falta información en cuanto a las similitudes y diferencias bioquímicas, así como la relación que existe entre los tricomas y la composición química de los clones de *T. cacao* L. que se encuentran en el banco de germoplasma de Padrón, INIA-Miranda, Venezuela. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue estudiar la relación existente entre los indicadores bioquímicos (contenido de compuestos fenólicos, proteínas solubles, prolina libre, carbohidratos totales, ligninas) y el número de tricomas, para

caracterizar el comportamiento en 26 clones de dicho banco.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las muestras se colectaron en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Padrón, INIA-Miranda, Estado Miranda, Venezuela (tabla 1).

Las muestras de *T. cacao* se colectaron en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Padrón, INIA-Miranda, Estado Miranda, Venezuela. Ubicado a 41 m s.n.m., a 10°13'14.1"N y 66°17'57.5"W. Las plantas muestreadas tenían 12 años de plantadas en bosque húmedo tropical, en un suelo franco-arcilloso, con pH 5,3, topografía plana y sin irrigación. La densidad de plantación fue de 1600 plantas.ha<sup>-1</sup> y la fertilización con 100 g NPK (12-12-17) + 50 g urea. La humedad osciló entre 72-89%, con un promedio de lluvias de 2441 mm.

Para los análisis bioquímicos y el conteo de tricomas, se tomaron las cuatro hojas verdes más jóvenes, de ramas plagiotrópicas de edad media de acuerdo al número de ramas, de tres plantas de cada clon evaluado de *T. cacao* L., inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la realización de las extracciones.

### Compuestos fenólicos

La extracción y determinación de fenoles se desarrolló de acuerdo al método de Friend, (1992) con modifica-

ciones. Para ello, las hojas (limbos foliares, sin pecíolo ni nervio central) se maceraron en nitrógeno líquido hasta polvo fino (0,1 g por triplicado de la mezcla de hojas de cada material vegetal) y se extrajeron tres veces con metanol hasta volumen final 1mL (*fenoles solubles*). Los residuos se secaron y se hidrolizaron con 0,25 mL de NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>, 16 h a 70 °C. Posteriormente se adicionó 0,25 mL HCl 2 mol.L<sup>-1</sup>. La mezcla se centrifugó a 15 000 g por 5 min y se colectó el sobrenadante (*fenoles ligados a la pared*). El residuo se lavó con 7 mL de agua destilada, se ajustó a pH 7,5 (con NaOH/HCl) y se enrazó a 10 mL con agua destilada (*ligninas*).

Los fenoles solubles y ligados a la pared se determinaron con el reactivo Folin-Ciocalteu. Una alícuota de cada extracto se diluyó a 1 mL con agua destilada y se adicionó 0,1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 min se adicionó 0,6 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado en NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Se incubó 60 min en la oscuridad. La medición de la coloración desarrollada se realizó en espectrofotómetro a 725 nm. La concentración de fenoles se expresó en mg. g<sup>-1</sup> de masa fresca (MF), equivalente a una curva patrón de ácido clorogénico. Los fenoles totales se calcularon con la sumatoria de los fenoles solubles y los ligados a la pared.

Para la cuantificación de ligninas se añadió 4 mL de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 12) en 1 mL de cada extracto y 4 mL de buffer fosfato (pH 7) en otro mL. La absorbancia se midió 350 nm, extracto a pH 12 contra el de pH 7. Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia (UA) por 0,1 g MF.

**Tabla 1.** Clasificación de los 26 clones de *T. cacao* L. colectados en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Padrón, INIA-Miranda, Estado Miranda, Venezuela. Tipos Forastero (F) y Trinitario (T).

No	Clon	Tipo	No	Clon	Tipo
1	Torno 3	T	14	PLA- 1	F
2	Concepción 164	T	15	PLA- 2	F
3	Cuira 32	T	16	PLA- 3	F
4	IMC-67	F	17	PLA- 4	F
5	Ocumare 61	T	18	PLA-1 x SC-10	T
6	Ocumare 67	T	19	EEM-003	T
7	Panaquirito 75	T	20	EEM-001	T
8	Peniche 158	T	21	Cumbo-177	T
9	UF 12	T	22	EET-250	T
10	SCA 6	F	23	PV-1 x IMC-11	T
11	SC- 6	T	24	OC-61 x PLA-159	T
12	SC- 8	T	25	IMC-67 x SC-10	T
13	SC- 10	T	26	IMC 67x Ocu 61	T

### Proteínas solubles

Para la extracción de las proteínas solubles, se partió de hojas maceradas de igual forma que para los fenoles. Se añadió 1 mL de buffer de extracción (Urea: 6 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA: 10 mmol.L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, β-mercaptoetanol: 14 mmol.L<sup>-1</sup>, Tween-20 (0,05 %), Tris HCl: 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH= 8) a 0,1 g de material vegetal (triplicado de la mezcla de hojas de cada material vegetal). La mezcla se homogenizó y se centrifugó en frío a 4°C por 10 min. El sobrenadante se colectó para la cuantificación. La concentración de PST se determinó de acuerdo a Bradford, (1976) y la medición de la coloración desarrollada se realizó en espectrofotómetro a 595 nm. La concentración se expresó en mg.g<sup>-1</sup> MF, equivalente a una curva patrón de albúmina de suero bovino.

### Carbohidratos totales y prolina libre

La extracción de carbohidratos y prolina libre se realizó a hojas maceradas con el procedimiento de los fenoles. Se agregó 10 mL de metanol: agua 80% (v:v) a 1 g de material vegetal (triplicado de la mezcla de hojas de cada material vegetal). La mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó a temperatura ambiente a 4000 g por 8 min. La extracción se repitió 2 veces. Los sobrenadantes se colectaron, unificaron y filtraron con papel de filtro. La fase etanólica se eliminó a vacío en roto-evaporador. La fase acuosa se colectó para las cuantificaciones.

La concentración de carbohidratos se determinó de acuerdo al método de Dubois *et al.*, (1956). A 1 mL de extracto, se adicionó 0,5 mL de mezcla fenol: agua 5% (v:v) y 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado cuidadosamente. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La medición de la coloración desarrollada se realizó en espectrofotómetro a 492 nm. La concentración de carbohidratos totales se expresó en µg.g<sup>-1</sup> MF, equivalente a una curva patrón de glucosa.

La concentración de prolina libre se determinó de acuerdo a Bates *et al.*, (1973). A 0,5 mL del extracto vegetal se adicionó 0,5 mL de ninhidrina y 0,5 mL de ácido acético. Posteriormente se agitó y colocó en baño de maría a 100°C por 1h. Se agregó 1 mL de tolueno y se agitó fuertemente. La absorbancia se determinó a la fase orgánica a 520 nm. La concentración se expresó en µg.g<sup>-1</sup> MF, equivalente a una curva patrón de L-prolina.

### Conteo de tricomas

El número y tipo de tricomas por campo visual se contó directamente en microscopio óptico, partiendo de la lámina epidérmica de la cara abaxial de las hojas de los 26 clones (seis réplicas del total de hojas de cada material vegetal). Las evaluaciones se realizaron en microscopio LEICA DM 3000 con lente 20x.

### Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el utilitario Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (versión 20 para Windows, SPSS Inc.). Se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA de un factor y bifactorial, Tuckey). Para estudiar la relación entre el número de tricomas y la composición bioquímica de las hojas, se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP). Este análisis se realizó con InfoStat (versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los detalles del tratamiento estadístico aparecen en cada figura o tabla de resultados y discusión.

### Resultados y discusión

La concentración de fenoles solubles, fenoles ligados a la pared, lignina, proteínas solubles y prolina libre en 26 clones de *T. cacao* se muestra en la tabla 2.

Para los fenoles solubles, los clones 16 y 22 mostraron, sin diferencias significativas, los mayores valores con 9,92 y 9,71 mg.g<sup>-1</sup> MF respectivamente y el clon 17 la menor, con 4,98 mg.g<sup>-1</sup> MF. Mientras que en los clones 9, 14 y 25 se encontraron la mayor concentración de fenoles ligados a la pared, con 13,71; 14,17 y 13,99 mg.g<sup>-1</sup> MF respectivamente y sin diferencias significativas, el menor valor se encontró en el clon 22. Al analizar los fenoles totales, los clones 9 y 25 fueron los superiores, sin diferencias significativas entre ellos y con una concentración de 22,69 y 23,37 mg.g<sup>-1</sup> MF, le siguen los clones 2 y 16 con 21,87 y 21,27 mg.g<sup>-1</sup> MF y posteriormente el 6, 14 y 18, con 19,73; 20,27 y 20,07 respectivamente.

Se puede apreciar además, que para las ligninas fue el clon 1, con 0,35 UA, el de mayor contenido de ligninas y los menores valores estuvieron en los clones: 2, 3, 9, 20 y 26, con 0,10; 0,10; 0,10; 0,10 y 0,09 UA respectivamente y sin diferencias significativas. Estos resultados indican una mayor concentración de compuestos fenólicos ligados a la pared que los solubles y no coinciden los clones que tienen mayor concentración de ambos tipos de fenoles. Los compuestos fenólicos son parte importante de la defensa activa de plantas. Estos compuestos se pueden sintetizar y movilizar en condiciones de estrés y en ocasiones se esterifican para formar parte de la pared celular y de lignina (Fry, 1987; Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Cabrera-Soto *et al.*, 2009). En este caso, todas las plantas estaban expuestas a condiciones similares de cultivo y sin síntomas de enfermedades, por lo que no se puede afirmar que las diferencias en la composición de fenoles estén asociadas a respuesta a un determinado tipo de estrés.

Se puede apreciar que para el caso de las proteínas solubles los clones: 3, 5 y 18 mostraron las mayores concentraciones, con 5,84; 5,86 y 8,84 mg.g<sup>-1</sup> MF, los menores se encontraron para el clon 4, con 1,12



**Tabla 2.** Concentración de fenoles solubles ( $F_s$ ), fenoles ligados a la pared ( $F_{LP}$ ), fenoles totales ( $F_T$ ), lignina ( $L_g$ ), proteínas solubles ( $P_s$ ), carbohidratos totales ( $C_T$ ) y prolina libre ( $P_L$ ) en 26 clones de *T. cacao* L.

Clon	$F_s$ (mg.g <sup>-1</sup> MF)	$F_{LP}$ (mg.g <sup>-1</sup> MF)	$F_T$ (mg.g <sup>-1</sup> MF)	$L_g$ (UA)	$P_s$ (mg.g <sup>-1</sup> MF)	$C_T$ (μg.g <sup>-1</sup> MF)	$P_L$ (μg.g <sup>-1</sup> MF)
1	7,30 fg	11,55 cde	18,84 ef	0,34 a	1,64 de	23,88 bc	20,55 abcde
2	8,68 de	13,19 b	21,87 b	0,10 i	4,24 bcde	19,11 def	19,94 abcde
3	7,25 fg	10,66 ghij	17,91gh	0,10 i	5,84 ab	10,52 ijk	4,37 g
4	7,42 fg	10,42 hijk	17,85 h	0,15 efg	1,12 e	23,79 c	5,94 g
5	7,26 fg	11,49 cdef	18,75 ef	0,21 bc	5,86 ab	12,27 hij	10,59 cdefg
6	7,46 f	12,28 c	19,73 cd	0,12 ghi	1,78 de	11,59 ijk	14,98 abcdef
7	9,31 bc	10,09 jk	19,39 de	0,21 b	2,12 de	28,13 ab	15,17 abcdef
8	5,20 jk	8,84 l	14,04 o	0,16 def	4,29 bcde	30,73 a	14,12 bcdefg
9	8,98 cd	13,71 ab	22,69 a	0,10 i	3,48 bcde	14,19 ghi	22,74 abc
10	7,54 f	11,07 defgh	18,61 fg	0,16 def	2,76 bcde	7,75 k	7,32 efg
11	5,55 ij	10,25 ijk	15,80 kl	0,14 efgh	2,22 cde	17,62 efg	21,34 abcd
12	5,13 jk	7,49 m	12,62 p	0,12 ghi	4,74 bcd	17,92 efg	21,88 abc
13	6,95 g	8,33 l	15,28 lm	0,22 b	2,38 b	22,27 cd	21,33 abcd
14	6,10 h	14,17 a	20,27 c	0,13 fghi	2,05 fghi	31,17 a	13,74 bcdefg
15	6,16 h	9,87 k	16,04 jk	0,19 bcd	3,91 bcd	23,77 c	14,76 bcdefg
16	9,92 a	11,36 defg	21,27 b	0,14 fgh	1,62 fgh	21,45 cde	16,33 abcdef
17	4,98 k	11,64 cde	16,61 ij	0,11 ghi	4,51 ghi	21,52 cde	19,63 abcde
18	8,31 e	11,77 cd	20,07 cd	0,12 fghi	8,84 fghi	10,69 ijk	8,10 defg
19	5,83 hi	8,15 lm	13,98 o	0,18 cde	3,57 cde	18,71 def	28,21 a
20	5,82 hi	11,02 defgh	16,84 i	0,10 i	3,25 i	10,40 ijk	17,35 abcdefg
21	5,86 hi	8,56 l	14,41 no	0,11 hi	5,38 hi	19,44 def	23,49 abc
22	9,71 ab	5,13 n	14,83 mn	0,12 ghi	2,66 ghi	16,44 fgh	6,34 fg
23	5,97 hi	8,30 l	14,26 no	0,13 fghi	2,49 fghi	15,95 fgh	15,12 abccdefg
24	5,97 hi	10,79 fghij	16,77 ij	0,14 fgh	2,95 fgh	8,48 jk	26,30 ab
25	9,39 bc	13,99 a	23,37 a	0,14 fgh	3,26 fgh	8,88 jk	19,53 abcdef
26	5,80 hi	10,91 efghi	16,71 ij	0,09 i	2,90 i	24,82 bc	21,29 abcd
ET	0,13	0,20	0,19	0,01	0,84	1,11	3,42

\* Valores en cada columna representan la media de cada tratamiento. Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA simple, Tukey,  $p \leq 0,05$ , Error Típico (ET).

mg.g<sup>-1</sup> MF. En los carbohidratos totales las mayores concentraciones se encontraron en los clones: 7, 8 y 14, con 28,13; 30,73 y 31,17 μg.g<sup>-1</sup> MF respectivamente, mientras que la menor concentración fue para el clon 10, con 7,75 μg.g<sup>-1</sup> MF. Al analizar la prolina libre, los clones 19 y 24 fueron superiores, con 28,22 y 26,29 μg.g<sup>-1</sup> MF, mientras que los clones: 3, 4 y 22 mostraron menores concentraciones con 4,37; 5,94 y 6,34 μg.g<sup>-1</sup> MF.

En cuanto al número y tipo de tricomas, en la figura 1 se puede observar que se encontraron tricomas glandulares (señalados en figura 1 a, g, h, i), no glandulares estrellados (señalados en figura 1 a, b, c, i) y no glandulares simples (señalados en figura 1 d, e, f).

No hubo diferencias en el tipo de tricomas para los 26 los clones evaluados, se observó un comportamiento similar en todos los casos, con tricomas glandulares, no glandulares estrellados y no glandulares simples, aunque el tipo más frecuente fue el no glandular estrellado.

Como se puede observar en la figura 1 (a-i), los tricomas de cacao mostraron diversidad en cuanto a número y tipo, así como en las ramificaciones de los no glandulares estrellados. Se encontró además, la acumulación de compuestos coloreados dentro de las mismas, los cuales pueden ser fenólicos u otros metabolitos de interés como terpenos, entre otros (Tattini *et al.*, 2000, McDowell *et al.*, 2011). No obstante, para

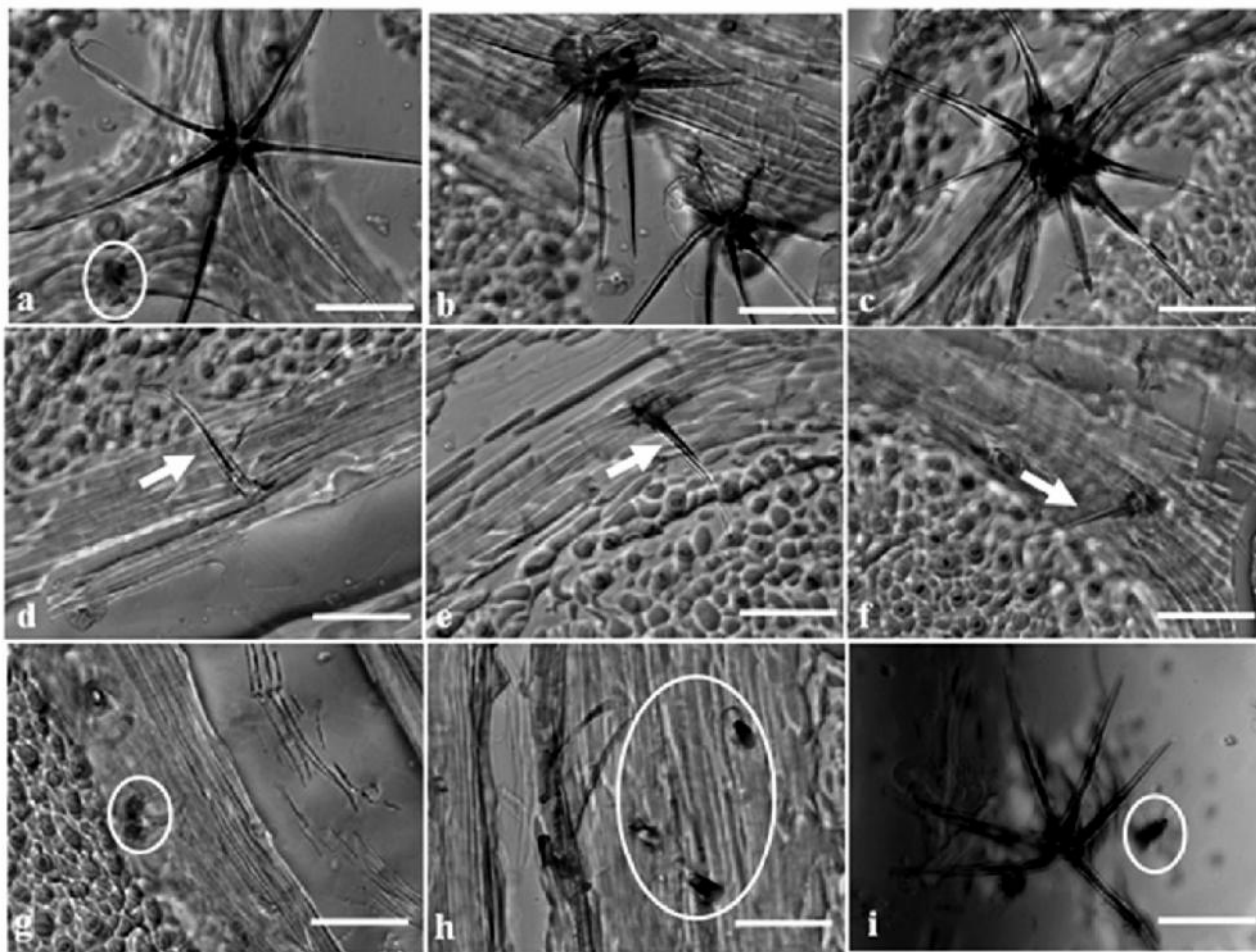
corroborar el tipo de compuestos presente es necesario recurrir a otros tipos de microscopía.

El número de tricomas varió en dependencia del clon, aunque la mayoría de los clones no mostraron diferencias significativas. La mayor cantidad de tricomas se encontró en los clones 5, 23 y 26, con 45, 40 y 40 tricomas  $\text{mm}^{-2}$ , sin diferencias significativas, y la menor en el clon 10, con 15 tricomas  $\text{mm}^{-2}$ . En hojas de papa y tomate, los tricomas contienen fenoles y enzimas oxidadoras de fenoles (polifenol oxidasas) que pueden matar insectos, dentro de los que se encuentran los áfidos (Peter y Shanower, 1998). Es por ello que resulta de gran interés agrupar los clones por sus compuestos mayoritarios, así como evaluar si existe relación entre el número de tricomas y los compuestos químicos de las hojas de *T. cacao*.

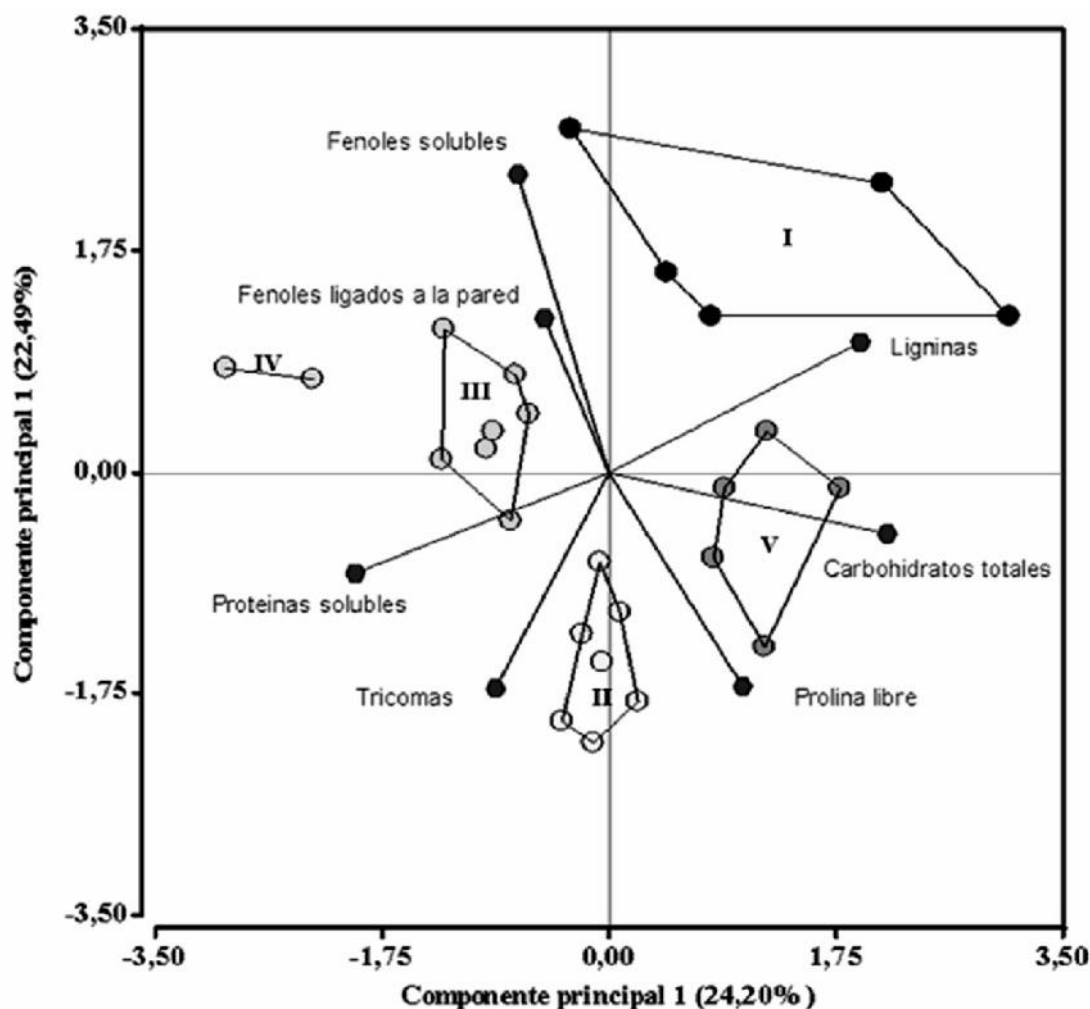
En la figura 2 se muestra el análisis de la relación entre los 26 clones estudiados de *T. cacao*, su contenido de prolina libre, proteínas solubles, carbohidratos totales, ligninas, fenoles solubles, fenoles ligados a la pared y el número de tricomas.

Los resultados muestran que en el espacio bidimensional, que explica el 46,68% de la variabilidad total, se definieron cinco grupos homogéneos. El grupo 1 (I), formado por los clones: 4, 16, 7, 10, 1, asociados a la máxima concentración de ligninas. El grupo 2 (II) formado por los clones 17, 12, 15, 26, 21, 23 y 24, asociado a plantas con hojas con el mayor número de tricomas. Los grupos 3 (III) y 4 (IV) formados por los clones: 2, 5, 6, 9, 20, 22, 25; y 3, 18 respectivamente, asociados a altos contenidos de proteínas solubles, fenoles solubles y ligados a la pared y el grupo 5 (V), formado por los clones: 14, 8, 13, 11, 19 respectivamente, asociados al gradiente de máximo contenido de prolina libre y carbohidratos totales.

Al comparar los tipos de cacao (forastero y trinitario), en cuanto a la concentración de fenoles totales, lignina, proteínas solubles y prolina libre (tabla 3) se encontró que los clones trinitarios tienen mayor contenido de proteínas solubles y prolina libre que los forasteros. Mientras que estos últimos superan a los trinitarios en



**Figura 1.** Tipos de tricomas identificados en superficie de hojas adultas de *T. cacao* L., clon 5 (Ocumare 61). Tricomas no glandulares estrellados complejos (a, b, c, i). Tricomas no glandulares simples (d, e, f). Tricomas glandulares (a, g, h, i). Barra escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Relación entre clones de *T. cacao* L. Grupos formados por el componente principal 1 en prolina libre, proteínas solubles, carbohidratos totales, ligninas, fenoles solubles, fenoles ligados a la pared y número de tricomas. Grupos: I (clones 4, 16, 7, 10, 1), II (clones 17, 12, 15, 26, 21, 23 y 24), III (clones 2, 5, 6, 9, 20, 22, 25), IV (3, 18) y V (clones: 14, 8, 13, 11, 19).

fenoles totales (fenoles solubles + fenoles ligados a la pared) y carbohidratos.

Es interesante señalar que: las sustancias producidas por las partes aéreas de las plantas pueden ser carbohidratos, aminoácidos orgánicos, fenoles y otros compuestos, dentro de los fenoles están los taninos, que generalmente son toxinas por su capacidad de unirse a proteínas y actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que pueden ser dañinos a las plantas, sin embargo pueden tener efecto positivo en la salud humana (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Para el caso de los fenoles totales (tabla 3), su concentración superior en clones forasteros puede estar relacionado con que este tipo de cacao es más resistente y de menor calidad para la industria por su alto contenido de fenoles, dentro de los que se encuentran los taninos,

con una mayor concentración en estos clones (Figueira et al., 1997).

Las diferencias cuantitativas encontradas en el contenido de fenoles (tabla 2) entre los clones, se asocian mayormente al genotipo, debido a que las plantas tenían igual edad y estaban cultivadas en similares condiciones, lo que coincide con lo planteado por Zapata et al. (2000) que demostró, en tabaco, que los fenoles dependen de la edad, el estado de desarrollo y el genotipo. Niemenak et al., (2006) encontraron que los fenoles totales, catequina, epicatequina y antocianina en semillas frescas y fermentadas de *T. cacao* L., fueron dependientes del genotipo pero no observaron diferencias cualitativas en el contenido de polifenoles en relación con su origen genético, las diferencias se relacionaron más con las condiciones de crecimiento. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró dife-

**Tabla 3.** Concentración de fenoles totales, lignina, proteínas solubles, carbohidratos y prolina libre entre clones trinitarios (T) y forasteros (F) de *T. cacao* L.

Tipo	Fenoles Totales (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Lignina (UA)	Proteínas solubles (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Carbohidratos totales (μg.g <sup>-1</sup> MF)	Prolina libre (μg.g <sup>-1</sup> MF)
T	17,41 b	0,15 a	3,69 a	17,10 b	17,64 a
ET	0,40	0,01	0,25	0,83	0,92
F	18,44 a	0,14 a	2,66 b	21,58 a	12,95 b
ET	0,46	0,01	0,30	1,70	1,55

Valores en cada columna representan la media de cada tratamiento. Medias con letras distintas difieren significativamente según pruebas paramétricas de ANOVA bifactorial, Tukey,  $p \leq 0,05$ , Error Típico (ET).

rencias en la concentración de fenoles, carbohidratos, proteínas y prolina asociadas al genotipo y también al origen genético, ya que en los forasteros la concentración de fenoles totales y carbohidratos totales fue superior a los trinitarios (tabla 4), en tanto que los trinitarios fueron mayoritarios en proteínas solubles y la prolina libre. Además, todos los indicadores evaluados variaron entre los diferentes clones (tabla 3).

Coincidiendo con Chen *et al.*, (2005) plantean que las proteínas solubles, la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y su contenido activasa, así como la actividad de la sacarosa fosfato sintasa, decrecen significativamente, mientras que el contenido de azúcares solubles, fosfato inorgánico, clorofilas y el complejo II de la fotosíntesis incrementaron en hojas de arroz aclimatizadas con aire enriquecido con CO<sub>2</sub>. En la actualidad se conoce que las proteínas se encuentran en baja concentración en los tejidos vegetales en comparación con animales y bacterias, además en plantas maduras son más difíciles de extraer por el espesor de la pared celular (Islam *et al.*, 2004). Por otra parte, los compuestos fenólicos combinan con las proteínas por condensaciones covalentes (Carpentier *et al.*, 2005) y las proteínas como la Rubisco son muy abundantes, lo que puede dificultar la detección de las que están en menor abundancia (Neilson *et al.*, 2010; Balbuena *et al.*, 2011).

Matt *et al.*, (2002) transformaron plantas de tabaco con una construcción antisentido de Rubisco para estudiar las consecuencias de una lesión en el metabolismo del carbono fotosintético en el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo secundario. Ellos demostraron que la inhibición de la fotosíntesis y el decrecimiento del contenido de azúcares conllevan a la inhibición del metabolismo de nitrógeno y a cambios dramáticos en la composición de los metabolitos secundarios de las hojas, como ácido clorogénico y nicotina, que son ricos en carbono y nitrógeno en su estructura, respectivamente. Demostraron además que los cambios en la razón aminoácido: azúcares se relacionaron con cambios en la razón nicotina: ácido clorogénico. Estos

resultados se corresponden con los presentados en la tabla 4, donde en el grupo que presentó mayor concentración de fenoles (clones forasteros), se encontró también mayor concentración de carbohidratos.

Por otra parte, las proteínas, carbohidratos y prolina juegan papeles importantes en la respuesta al estrés, donde se ha demostrado que en hojas infectadas por *C. pernicioso* decrecen las proteínas solubles (Frias *et al.*, 1991). También se ha encontrado que en hojas de plantas de *T. grandiflorum* infectadas por hongo, se afecta el contenido de clorofilas y por lo tanto se afecta también la fotosíntesis y la síntesis de carbohidratos, así como se producen variaciones en las concentraciones de fenoles (Oliveira *et al.*, 1997).

Como se puede observar, los grupos que se forman con el ACP no se relacionan con el tipo de cacao, pues los clones forasteros y trinitarios quedan mezclados dentro de los diferentes grupos (figura 2). En la tabla 3, el grupo de los clones forasteros mostraron mayor concentración de carbohidratos y fenoles, los trinitarios en prolina y proteínas, y no existieron diferencias entre los dos grupos para ligninas. Sin embargo, en el ACP los clones se agruparon de otra manera: cinco clones, se asociaron por su alto contenido de ligninas (tres forasteros y dos trinitarios), otros cinco por la alta concentración de prolina y carbohidratos totales (dos forasteros y tres trinitarios), nueve por su alto contenido de proteínas y fenoles (todos trinitarios) y siete con mayor número de tricomas (un forastero y seis trinitarios). Contrario a lo esperado, en el análisis de ACP, el mayor número de estructuras acumuladoras de metabolitos (tricomas) se relacionó más con la mayor concentración de proteínas solubles y la prolina libre que con el resto de los parámetros evaluados.

En el caso de los tricomas, se conoce que la combinación de tricomas glandulares y no glandulares confiere resistencia a diferentes plagas, debido a que los glandulares contienen o secretan mezclas de compuestos químicos y los no glandulares sirven de barrera mecánica sobre todo para los insectos (Peter y Shanower, 1998). Los clones con mayor número de fenoles no



resultaron asociados a los mayores contenidos de tricomas. Lo cual no descarta el hecho de que existan tipos de fenoles que se encuentren en los tricomas, o secretados por ellos y que sean de importancia por su actividad biológica, lo que los haría interesantes para la farmacia, control de patógenos y obtención de pigmentos o aromatizantes. No obstante, para seleccionar clones por la producción de compuestos en los tricomas habría que evaluar no solo cuáles son los de mayor número, sino el perfil de metabolitos presentes en los tricomas de cada clon y el valor de los mismos por su actividad.

En plantas del género *Solanum* existen seis tipos de tricomas y en todos los de tipo 1, 4 y 6 se encontraron genes para la biosíntesis de metabolitos como flavonoides, azúcares acetilados y terpenoides (McDowell et al., 2011). Hasta ahora en cacao no se ha descrito que tipo de compuestos pueden estar en los tricomas, pero si se conoce que hay tricomas glandulares y no glandulares (Bailey et al., 2009) y que además hay un alto contenido de fenoles, por lo que también podría existir síntesis y secreción de compuestos similares a los descritos para *Solanum*.

Finalmente, los clones analizados en la presente investigación no estaban visiblemente infectados por ningún patógeno, no obstante, dentro de los 26 clones existen algunos con mayor resistencia a patógenos que otros. Por lo que las concentraciones de los compuestos analizados pueden estar apuntando a mayor cantidad de ellos en clones resistentes que en los susceptibles a enfermedades fungosas. Por ejemplo, en investigaciones previas realizadas en el banco de germoplasma del que se seleccionó el material evaluado, el clon 3 (alto contenido de proteínas y fenoles) es resistente a *P. palmivora* y a *C. frimbriata*, el clon 8 (alto contenido de carbohidratos y prolina) es moderadamente resistente a *P. palmivora*, el clon 4 (alto contenido de ligninas) es resistente a *C. frimbriata* y tiene baja incidencia de *M. royeri*, el clon 24 (mayor número de tricomas) es resistente a *P. palmivora* (Reyes et al., 1973; González et al., 2009; González et al., 2011; Morillo et al., 2012). Además, cuando el 19 (alto contenido de carbohidratos y prolina) fue utilizado como madre en dos cruces (19 x 4 y 19 x 22), la descendencia de ambos mostraron baja incidencia de *P. palmivora* en frutos cosechados y baja incidencia de *M. pernicioso* como escobas vegetativas y en cojines florales. Estos cruces presentaron buenos índices de productividad, valores de índice de almendra > 1,3 y de índice de mazorca < 22 (González et al., 2011). Lo que corrobora que cada grupo obtenido ofrece la posibilidad del manejo de sus clones en dependencia de su composición química y el futuro uso.

## Conclusiones

Este estudio demostró que existen cinco grupos, de acuerdo a la relación existente entre la concentración

de compuestos bioquímicos y los tricomas de hojas de 26 clones de *T. cacao*. Cinco clones, se asociaron por su alto contenido de ligninas, otros cinco por la alta concentración de prolina y carbohidratos totales, nueve por su alto contenido de proteínas y fenoles y siete con mayor número de tricomas, de acuerdo al ACP que explica el 46,68% de la variabilidad total. Además, el grupo de los clones forasteros mostró mayor concentración de fenoles totales y carbohidratos, en tanto que los trinitarios presentaron mayor concentración de proteínas y prolina. Los resultados obtenidos pueden servir de base para la selección de clones, teniendo en cuenta el contenido de los diferentes parámetros evaluados, en dependencia del interés de las futuras investigaciones.

## Agradecimientos

Los autores agradecemos el financiamiento otorgado al proyecto "Metabolitos Secundarios en *Theobroma cacao* L.", en el marco de la Instrumentación de la Alternativa Bolivariana para los Pueblos de Nuestra América, a partir de la Modificación y Ampliación del Convenio Integral de Cooperación Cuba - Venezuela "VII Comisión Mixta", que permitió realizar la investigación y procesamiento estadístico de los datos.

## Referencias

- Afoakwa, E. O., Jennifer, Q., Agnes, S. B., Jemmy, S. T., y Fribu, K. S. (2012a). Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 19(1), 127-133.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, F. S., Budu, A. S., y Saalia, F. K. (2012b). Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 19 (3), 1071-1077.
- Ávalos, A., y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145.
- Bailey, B.A, Strem, M.D., y Wood, D. (2009). Trichoderma species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological Research*, 113, 1365-1376.
- Balbuena, T.S., Dias, L.L.C., Martins, M.L.B., Chiquieri, T.B., Santa-Catarina, C., Floh, E.I.S., y Silveira, V. (2011). Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(2), 91-104.
- Bates, L.S., Waldron, R.P., y Teare, L.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cabrera-Soto, M.L., Salinas-Moreno, Y., Velázquez-Cardelas, G.A., y Espinosa-Trujillo, E. (2009). Content of soluble and insoluble phenols in the structures of corn grain and their relationship with physical properties. *Agrociencia*, 43, 827-839.
- Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., y Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for

- two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5, 2497-2507.
- Chen, G.Y., Yong, Z.H., Liao, Y., Zhang, D.Y., Chen, Y., Zhang, H.B., Chen, J., Zhu, J.G., y Xu, D.Q. (2005). Photosynthetic Acclimation in Rice Leaves to Free-air CO<sub>2</sub> Enrichment Related to Both Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylation Limitation and Ribulose-1,5-bisphosphate Regeneration Limitation. *Plant Cell Physiology*, 46 (7), 1036-1045.
- Cimato, A., Mattei, A., y Osti, M. (1990). Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Horticulturae*, 286, 453-456.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Edwards, H.G.M., Villar, J.S.E., de Oliveira, L.F.C., y Le Hyaric, M. (2005). Analytical Raman spectroscopic study of cacao seeds and their chemical extracts. *Analytica Chimica Acta*, 538, 175-180.
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, Ch., y Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in criollo, forastero and trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 2009, 937-948.
- Figueira, A., Lambert S., Carpenter, D., Pires, J., Cascardo, J., y Romanczyk, L. (1997). The similarity of cocoa flavour of fermented seeds from fingerprinted genotypes of *Theobroma cacao* L. from Brazil and Malaysia. *Tropical Agriculture*, 74(2), 132-139.
- Friend, J. (1992). Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In: Gurr, S.J., McPherson, M.J., Bowles, D.J. (eds.), *Molecular plant pathology: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 2, pp. 51- 59.
- Fry, S.C. (1987). Intercellular feruloylation of pectic polysaccharides. *Planta*, 171, 205-211.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O., y Gindro, K. (2009). Induction of defense mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 827-837.
- González, R.V., Girón, C., Vidal, R., Castillo, A., Parra, D., Movil, O., Rumbos, R., Subero, L., Navarro, R., Sánchez, P., y Marín, C. (2009). Final Progress Report "Cocoa Productivity and Quality Improvement: a Participatory Approach" (2004-2009). Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Estado Miranda, Venezuela, p 1.
- González, R.V., Giron, C., Sanchez, P., Castillo, A., Movil, O., Parra, D., y Vidal, R. (2011). Selection of new varieties on-farm and on-station in Venezuela. Collaborative and Participatory Approaches to Cocoa Variety Improvement. Final report of the CFC/ICCO/Bioversity project on "Cocoa Productivity and Quality Improvement: a Participatory Approach" (2004-2010). CFC, Amsterdam, The Netherlands/ICCO, London, UK/Bioversity International, Rome, Italy: Eskes AB, p 1.
- Gu, Y., Yu, S., Lambert, J.D. (2014). Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *European Journal of Nutrition*, 53, 149-158.
- Guehi, S.T., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D., K., y Zahouli, G.I.B. (2010). Effect of Turning Beans and Fermentation Method on the Acidity and Physical Quality of Raw Cocoa Beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3), 163-171.
- Guerrero, L., Margalef, M., Pons, Z., Quiñones, M., Arola, L., Arola-Arnal, A., y Muguerza, B. (2013). Serum metabolites of proanthocyanidin-administered rats decrease lipid synthesis in HepG2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 2092-2099.
- Horie, H., y Kobata, K. (2002). Major components in tea leaves. In: Muramatu et al. (eds) *Health science of tea* (Japanese), Gakkais-huppan center, Tokyo, pp. 26-31.
- InfoGen. (2009). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ishida, T., Kurata, T., Okada, K., y Wada, T. (2008). A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 365-386.
- Islam, N., Lonsdale, M., Upadhyaya, N.M., Higgins, T.J., Hirano, H., y Akhurst, R. (2004). Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. *Proteomics*, 4, 1903-1908.
- Kubo, I., y Matsumoto, A. (1984). Molluscicides from olive *Olea europaea* and their efficient isolation by countercurrent chromatographies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 687-688.
- Li, X., Liu, Z., Chen, Y., Wang, L.J., Zheng, Y.N., Sun, G.Z., y Ruan, C.C. (2009). Rubiacordone A: A new anthraquinone glycoside from the Roots of *Rubia cordifolia*. *Molecules*, 14, 566- 572.
- Lindow, S.E., y Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Apply Environment Microbioloy*, 69, 1875-1883.
- Martinez-Esteso, M.J., Selles-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A., y Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *Journal of Proteomics*, 73, 331-341.
- Matt, P., Krapp, A., Haake, V., Mock, H.P., y Stitt, M. (2002). Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *The Plant Journal*, 30(6), 663-677.
- McDowell, E.T., Kapteyn, J., Schmidt, A., Li, Ch., Kang, J.H., Descour, A., Shi, F., Larson, M., Schillmiller, A., An, L., Jones, A.D., Pichersky, E., Soderlund, C.A., y Gang, D.R. (2011). Comparative Functional Genomic Analysis of Solanum Glandular Trichome Types. *Plant Physiology*, 155, 524-539.
- Mishra, B.B., Kishore, N., Tiwari, V.K., Singh, D.D., y Tripathi, V. (2010). A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family Rutaceae). *Fitoterapia*, 81, 104-107.
- Morillo, F., Parra, D., Perozo, J., Movil, O., Pereira, Y., Rengifo, A., Solórzano, F., González, R., y Rengifo, J. (2012). Ataque de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.), por coquitos escopeteros (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) entre 2010-2011, Estado Miranda. Instituto nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Estado Miranda, Venezuela: *Revista Observador del Conocimiento*, p 13.
- Mulekar, J.J., y Huq, E. (2014). Expanding roles of protein kinase CK2 in regulating plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 65(11), 2883-93.
- Neilson, K.A. Gammulla, C.G., Mirzaei, M., Imin, N., y Haynes, P.A. (2010). Proteomic analysis of temperature stress in plants. *Proteomics*, 10, 828-845.
- Nicholson, R.L., y Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.
- Niemenak, N., Rohsius, Ch., Elwers, S., Ndoumou, D.O., y Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 612-619.
- Oliveira da Conceição, H.E., Mazzafera, P., Gomes da Rocha, O., y Benchimol, R.L. (1997). Biochemical Composition of *Theobro-*

- ma grandiflorum* leaves infected by *Crinipellis pernicios*a. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 9(2), 135-138.
- Pandey, R., y Mishra, A. (2010). Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. *Apply Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1356-1361.
- Peter, A.J., y Shanower, T.G. (1998). Plant glandular trichomes. Chemical factories with many potential uses. *Resonance*, March, 41-45.
- Petti, S., y Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37, 413-423.
- Pirovani, C.P., Carvalho, H.A.S., Machado, R.C.R., Gomes, D.S., Alvim, F.C., Pomella, A.W.V., Gramacho, K.P., Cascardo, J.C.M., Amarante, G., Pereira, G., y Micheli, F. (2008). Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora pernicios*a, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, 29, 2391-2401.
- Reyes, H.E., Perez, A.Z., Reyes, L.C.; y Wagner, O.M. (1973). Catálogo de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Estación Experimental de Caucagua, Estado Miranda, Venezuela, p 131.
- Rusconi, M., y Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the food of the gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61, 5-13.
- Sarria, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J.L., García-Diz, L., Mateos, R., y Bravo, L. (2014). Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. *British Journal of Nutrition*, 111, 122-134.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., y Romani, A. (2000). Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *Research New Phytology*, 148, 69-77.
- Tomihama T., Nishi Y., y Arai K. (2006). The effects of exopolysaccharide production and flagellum on motility, biofilm formation, survival and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. theae. *Japanese Journal of Phytopathology*, 72, 3-13.
- Van den Ende, W. (2014). Sugars take a central position in plant growth, development and, stress responses. A focus on apical dominance. *Frontiers of Plant Science*, 30, 247.
- Vivot, E., Sánchez, C., Cacik, F., y Sequin, C. (2009). Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Revista Cubana de Farmacia*, 43 (4), 1-10.
- Wagner, G.J. (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 96, 675-679.
- Wagner, M., Laborem, G., Marin, C., Medina, G., y Rangel, L. (2003). Proline content in valencia orange crops during five cycles as a function of water content in Fluventic Haplustolls soils. *Revista de la Facultad de Agronomía. LUZ*, 20, 119-130.
- Wagner, G.J., Wang, E., y Shephard, R.W. (2004). New approaches for studying and exploiting the plant trichome. *Annals of Botany*, 93, 3-11.
- Yooyongwech, S., Cha-um, S., y Supaibulwatana, K. (2012). Proline related genes expression and physiological changes in indica rice response to water-deficit stress. *Plant Omics Journal*, 5(6), 597-603.
- Zapata, J., Hernandez, M.; Ojeda, M.; Benlloch, M.; Prast, E.; Tena, M.; Lopez, R.; y Jorin, J. (2000). Toxic metals accumulation and total soluble phenolics in sunflower and tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38,178-80.

# Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina

## Polysaccharides production by *Ganoderma* sp., isolated from andina region

Xiomara López Legarda\*, Carolina Arboleda Echavarría\*\*, Freimar Segura Sánchez\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.47060

### Resumen

Los hongos de la podredumbre blanca de la madera, como *Ganoderma* sp., han sido utilizados alrededor del mundo por sus propiedades medicinales, ya que poseen compuestos bioactivos como los triterpenos y los polisacáridos. Esta investigación se centra en la producción de polisacáridos a escala de laboratorio y de biorreactor, a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina, utilizando como sustrato un residuo ligninocelulósico de la industria agrícola suplementado con glucosa y lactosa. Se encontró que las condiciones más adecuadas y viables para la producción de biomasa y polisacáridos de *Ganoderma* sp., son: medio Bio 3%, 10 días de incubación, lactosa 10%, pH= 4,0, T= 30°C, 300 rpm y 1 vvm. Los ensayos espectrofotométricos (fenol ácido sulfúrico y escaneo en UV entre 200 y 400 nm), enzimáticos y de infrarrojo permitieron identificar y cuantificar glucanos y algunas proteínas en los extractos, sugiriendo que los hongos endógenos de la región Andina poseen características propias de metabolitos importantes a nivel medicinal. Adicionalmente se demostró el efecto antiproliferativo en células J774, especialmente del extracto GIPSi (IC50= 86%) similar al efecto generado por estándares comerciales.

**Palabras clave:** fermentación, polisacáridos, hongos de la podredumbre blanca de la madera, antitumoral.

### Abstract

The white rot wood fungi like *Ganoderma* has been used worldwide because it has triterpenoids and polysaccharides with medicinal properties. This research focuses on determining the polysaccharide production conditions and laboratory and bioreactor scale, from the aforementioned fungi, isolated in the Andean region. It was used agricultural lignin-residue supplemented with glucose and lactose. We found that the most appropriate and feasible production conditions for biomass and *Ganoderma* polysaccharides are: Bio medium 3%, t = 10 days, 10% lactose, pH= 4,0, T= 30°C, 300 rpm and 1 vvm. The spectrophotometric, enzymatic and IR tests; allowed us to identify the presence of polysaccharides and proteins in some extracts, suggesting that the endogenous mushrooms in the Andean region also have characteristics similar to those of metabolites that are important in medicine. Additionally, the antiproliferative effect was observed in J774 sarcoma cells, particularly GIPSi extract (IC50= 86%) similar to the effect generated by commercial standards.

**Key words:** fermentation, polysaccharides, white rot fungi, antitumoral.

**Recibido:** enero 18 de 2015

**Aprobado:** octubre 1 de 2015

\* MSc., Biotecnología, Corporación Académica Ambiental. Microbióloga Industrial y Ambiental. Grupo de investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia (UdeA), Calle 70 #. 52-21, Medellín, Colombia. Autor de correspondencia: xiomara.lopezl@udea.edu.co

\*\* MSc., PhD Ciencias Químicas. Grupo de Investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia (UdeA), Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. carolina.arboleda@udea.edu.co

\*\*\* MSc., Ciencias Farmacéuticas, PhD Farmacotecnia y Biofarmacia. Grupo de Investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. freimar.segura@udea.edu.co



## Introducción

Durante siglos, diversas culturas alrededor del mundo han empleado a los hongos como fuente nutricional, medicinal y en procesos ambientales gracias a su composición y a los metabolitos que producen tanto en su ambiente natural como en el laboratorio (Zhao et al., 2010).

Se ha encontrado que muchos hongos macromicetos tienen potencial anticancerígeno entre los cuales se destacan géneros como *Ganoderma*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Agaricus*, *Schizophyllum*, entre otros (Chen et al., 2012; Benzie and Wachtel-Galor, 2011; Bishop et al., 2015; deVere et al., 2002); los cuáles están siendo utilizados en la actualidad por diversas empresas alrededor del mundo, especialmente en Asia Oriental, Australia y Norteamérica, para la producción y comercialización del hongo y de sus extractos como alimento funcional o como suplemento dietario.

La especie *Ganoderma lucidum* (Reishi en Japonés y Lingzhi en Chino) ha sido ampliamente estudiada a nivel mundial por sus propiedades alimenticias y medicinales. Históricamente se ha conocido como el “elixir de la vida”. Este hongo basidiomicete hace parte de los hongos de la podredumbre blanca de la madera y es reconocido por sus enzimas ligninolíticas y por sus propiedades medicinales tales como prevención de la obesidad; el mantenimiento de la salud intestinal; reducción de la hipertensión; control de la diabetes y la estimulación de probióticos (Bishop et al., 2015). La mayor parte de las investigaciones se han desarrollado en los países del este de Asia (Korea, China, Japón) en temáticas relacionadas con la producción, extracción e identificación de las sustancias bioactivas que posee *Ganoderma*. Sin embargo es necesario implementar más estudios para ampliar el conocimiento acerca de estos hongos en países con gran biodiversidad como Colombia.

Los polisacáridos de *Ganoderma*, han llamado la atención de la comunidad científica por los efectos que poseen sobre el sistema inmune, inflamaciones y cánceres exhibiendo efectos *in vitro* e *in vivo* como lo demuestran diversas investigaciones (deVere et al., 2002; Daba and Ezeronye, 2003). A nivel estructural, los polisacáridos fúngicos pueden encontrarse en forma de homopolisacáridos, heteropolisacáridos y glicoproteínas. En cultivos sumergidos se pueden obtener tanto intra como exopolisacáridos. Los intrapolisacáridos (IPS) se encuentran principalmente en la pared celular fúngica y los exopolisacáridos (EPS) son polisacáridos extracelulares liberados al ambiente donde se encuentran que los hongos utilizan principalmente como mecanismo de protección (Donot et al., 2012). Las propiedades medicinales de dichos polisacáridos dependen no solo de su estructura química, peso molecular, la conformación y configuración de los enlaces glucosídicos; sino también de las características biológicas y fisicoquímicas de la fermentación como

medios de cultivo utilizados, agitación, temperatura, pH entre otros (Donot et al., 2012; Fraga et al., 2014). Aunque no hay consenso sobre las mejores condiciones, la mayoría de los autores sugieren que la mayor producción de EPS se da a pH bajos y utilizando glucosa como sustrato (Donot et al., 2012).

A la fecha más de 200 polisacáridos han sido aislados a partir de basidiocarpos, esporas, micelio y cultivos líquidos de *Ganoderma* siendo éstos últimos los de preferencia para la explotación comercial, ya que encontrar el hongo en la naturaleza es difícil y la producción de basidiocarpo tarda varios meses. Adicionalmente, los cultivos sumergidos son más fáciles de controlar y se obtiene producción en poco tiempo, pero en la mayoría de los casos debido al proceso de producción y a los sustratos utilizados el producto final es muy costoso y de difícil acceso para la población general (Wagner et al., 2004; Benzie and Wachtel-Galor, 2011). Por lo tanto, se hace importante evaluar diferentes sustratos para la producción de polisacáridos y con mayor viabilidad económica; de manera que se traduzca en un producto más accesible y de buena calidad. Una alternativa es reducir los costos de producción utilizando residuos agroindustriales que sirven como fuente de carbono y nutrientes necesarios para el desarrollo del hongo y la generación de metabolitos como los polisacáridos.

Esta investigación se centra en la producción de polisacáridos en cultivo sumergido a escala de laboratorio y de biorreactor, a partir de un aislamiento de *Ganoderma* sp., tomado de la región andina, utilizando como sustrato un residuo lignocelulósico de la industria agrícola suplementado con glucosa y lactosa. A pesar de que algunos autores no han llegado a un consenso sobre la fuente de carbono óptima, se ha encontrado que la glucosa favorece el rendimiento de los EPS comparado con otros azúcares (Wagner et al., 2004; Fraga et al., 2014). Este hongo, fue elegido por su gran importancia a nivel industrial y medicinal, además de su potencial ligninolítico corroborada en investigaciones previas realizadas en el grupo de investigación Biopolimer (Arboleda et al., 2008; Arboleda and Mejía, 2010).

## Materiales y métodos

### Aislamiento fúngico

La cepa de *Ganoderma* sp., empleada para la realización de este trabajo, fue recolectada de un bosque húmedo del municipio de Puerto Berrío (Antioquia, Colombia), gracias a un permiso de recolección de hongos otorgado por el ANLA (Permiso No. 17, 2012) al grupo Biopolimer que tiene el interés de utilizar microbiota autóctona. Se realizaron preinóculos en el medio ligninolítico KIRK (Kirk, Croan et al., 1986) y agar papa dextrosa (PDA). El tiempo de incubación fue de 30±1°C. La cepa fue preservada a 4°C en el medio

de cultivo extracto de malta (MEA). Se realizaron tinciones con azul de lactofenol, rojo congo y KOH, para identificar las estructuras del hongo y llevar un seguimiento del cultivo tanto a nivel de Erlenmeyer como de biorreactor.

### **Evaluación de sustratos para producción de biomasa y polisacáridos**

Se utilizó como sustrato base una mezcla de residuos orgánicos que contienen carbono, nitrógeno y factores de crecimiento apropiados para el desarrollo del hongo. Para efectos de la investigación se asegura la uniformidad en la composición del medio y se le denominará sustrato Bio ya que es un medio de cultivo indefinido que fue patentado por el grupo de investigación Biopolimer ante la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (Rad N°11-160567, 2014) y fue licenciado a la spin off BIOINNCO SAS; empresa creada a partir de resultados de investigación del grupo Biopolimer.

Se evaluaron independientemente como inductores de polisacáridos glucosa y lactosa a tres niveles (1, 10 y 20 % p/v). Al finalizar la fermentación (10 días) se tomaron como variables de respuesta la biomasa producida en g/L y la concentración de EPS e IPS en g/L. El tratamiento de los datos se realizó mediante los análisis estadísticos de ANOVA y el procedimiento de la mínima diferencia significativa LSD de Fisher, utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.02.®

### **Fermentación en cultivo sumergido a nivel de laboratorio**

Se realizaron fermentaciones en Batch en Erlenmeyers de 250 mL de boca ancha con tapones de algodón-gasa, para facilitar la transferencia de gases, ya que el oxígeno es indispensable para el crecimiento del hongo. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital de 25 puestos con control de temperatura. Se tomó como unidad experimental cada Erlenmeyer. Los ensayos fueron independientes y se realizaron triplicados de cada uno para hallar la desviación estándar.

En todos los casos se utilizó como inóculo 3 discos de 5 mm de diámetro a partir de la trofofase del preinóculo en medio Kirk con 8 días de incubación y se adicionaron en condiciones asépticas a Erlenmeyers de 250 mL, utilizando como volumen de fermentación 40 mL, se adicionó sustrato Bio al 3% p/v, y los azúcares correspondientes para cada ensayo, todos se ajustaron a un pH inicial de  $4,0 \pm 0,1$  y se incubaron bajo agitación orbital a 150 rpm, y  $30 \pm 1$  °C, durante 10 días.

El peso seco de la biomasa se obtuvo mediante filtración. Se utilizó primero un tamiz de 100  $\mu$ m, se lavó la biomasa tres veces con agua desionizada y se filtró por Whatman No. 1, para luego secarla a 70°C hasta peso constante.

El proceso de extracción de polisacáridos se representa en la figura 1. Los polisacáridos se cuantificaron por el método de fenol-ácido sulfúrico con algunas modificaciones que se detallan a continuación (Masuko et al., 2005; DuBois et al., 1956): Se preparó una solución madre de glucosa a una concentración de 400 ppm y se realizaron cuatro diluciones entre 10 y 80 ppm con las cuáles se elaboró la curva de calibración. Para las lecturas se tomaron 400  $\mu$ L de solución de glucosa, se adicionaron 200  $\mu$ L de fenol e inmediatamente se adicionó sobre el líquido 1000  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado cuya reacción genera una coloración amarillenta. Se leyó la absorbancia a 490 nm, longitud de onda indicada para las hexosas, utilizando un espectrofotómetro (UV-Vis Varian CARY 50 Bio) (DuBois et al., 1956).

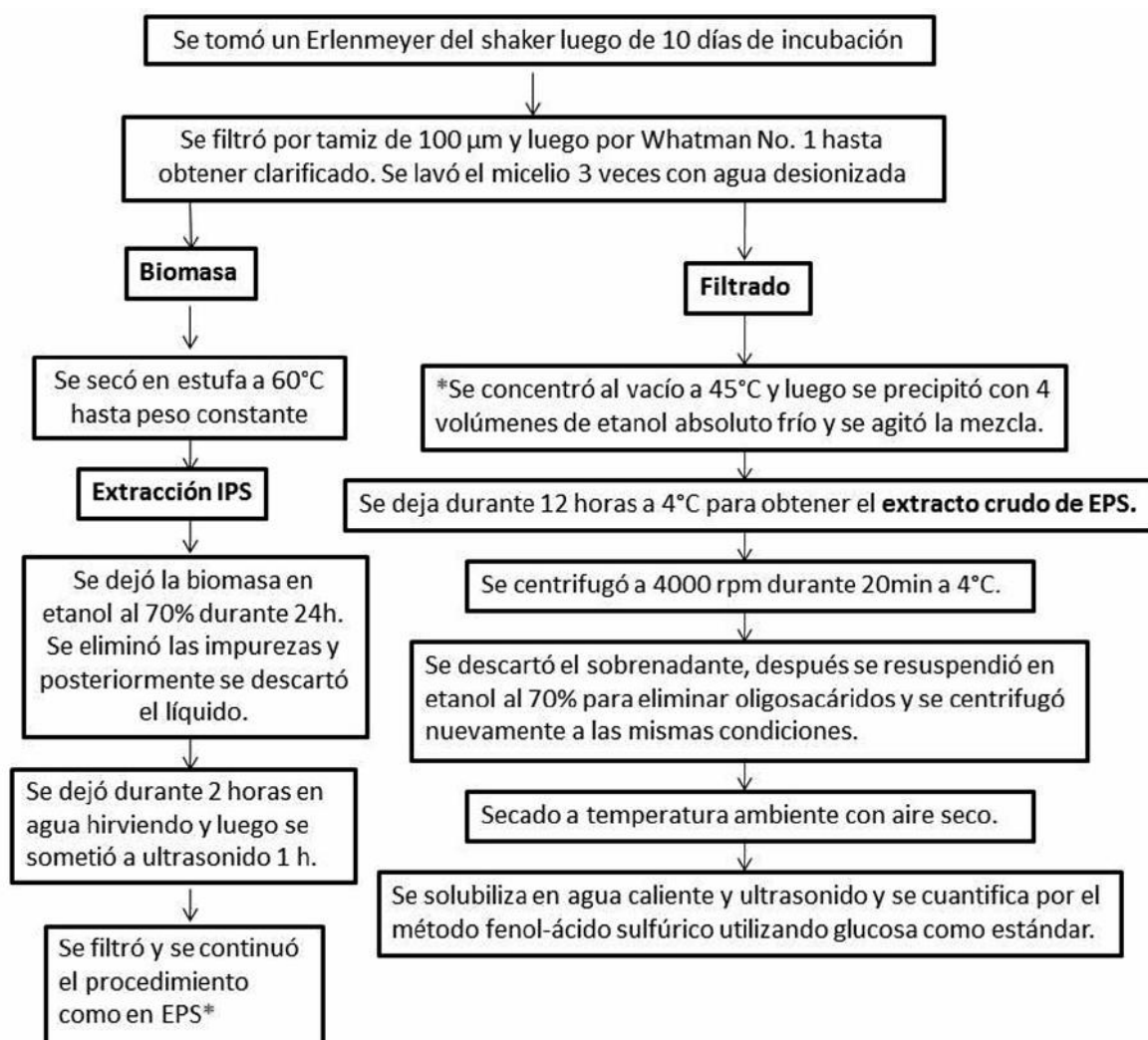
### **Fermentación en cultivo sumergido a nivel de biorreactor de 5L**

Se utilizó un biorreactor de marca BIOSTAT® Aplus de 7 L. Las condiciones fueron:  $30 \pm 1$  °C, 300 rpm, 5 L y 1 vvm. El preinóculo utilizado fue a partir de *Ganoderma* sp., en medio Bio + glucosa al 10% con 5 días de incubación y cuya cantidad fue del 10% del volumen de trabajo del Biorreactor. La determinación de biomasa y polisacáridos se hizo de igual forma que con el producto obtenido en Erlenmeyers con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Luego del proceso de extracción detallado en la figura 1, se toma una muestra de extracto crudo de polisacárido, se hizo diálisis durante 3 días con agua desionizada a 4 °C. Seguidamente se liofilizaron las muestras obteniéndose 4 extractos denominados de la siguiente manera: GEPSs: Exopolisacárido soluble de *Ganoderma*, GEPSi: Exopolisacárido insoluble de *Ganoderma*, GIPSS: Intrapolisacárido soluble de *Ganoderma*, GIPSi: Intrapolisacárido insoluble de *Ganoderma*.

Para los ensayos en UV, se tomaron 20 mg/mL de cada uno de los extractos; GEPSs y GIPSS se diluyeron en agua desionizada, y GEPSi y GIPSi se solubilizaron en NaOH 1M. Se hizo un escaneo de sus fracciones entre las longitudes de onda 200 y 400 nm para identificar proteínas (280 nm) y ácidos nucleicos (260 nm) (Zhao et al., 2015). Seguidamente se halló el porcentaje de  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos presente en los extractos, mediante el kit enzimático K-YBGL ® (Megazyme). Posteriormente, se utilizó la técnica instrumental de infrarrojo para identificar enlaces característicos de polisacáridos en los rangos. La muestra se preparó con KBr en polvo grado espectroscópico para formar una pastilla de 1 mm y posteriormente realizar las mediciones de infrarrojo entre las longitudes de onda 1000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Ramos, 1990; Zhao et al., 2015).

### **Ensayo de actividad biológica**

Se realizaron ensayos de bioactividad (Zhao et al., 2015; Nie et al., 2013) de los extractos para la deter-



**Figura 1.** Procedimiento utilizado para la extracción de polisacáridos de cultivo sumergido de *Ganoderma* sp., fue realizado a partir de la modificación de procedimientos de varios autores (Donot *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2013; Ruthes *et al.*, 2015).

minación de su capacidad antitumoral en cultivos de líneas celulares cancerígenas con la ayuda y experticia del grupo de investigación GIM de la Universidad de Antioquia. Se utilizaron las líneas celulares, sarcoma de ratón J774 para evaluar el efecto antitumoral y VERO para evaluar la citotoxicidad en células humanas; gentilmente donadas por el laboratorio 6, del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, España. Éstas, fueron crecidas en el medio RPMI 1640 (Gibco®) y suplementadas con 10% de FBS (Fetal Bovine serum), 1000 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Para el tratamiento con los extractos, las células se cultivaron a 1500 células/pozo en platos de 96 a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC50) se realizó un ensayo colorimétrico (MTT) el cual mide la proliferación celular. Las células fueron resuspendidas en

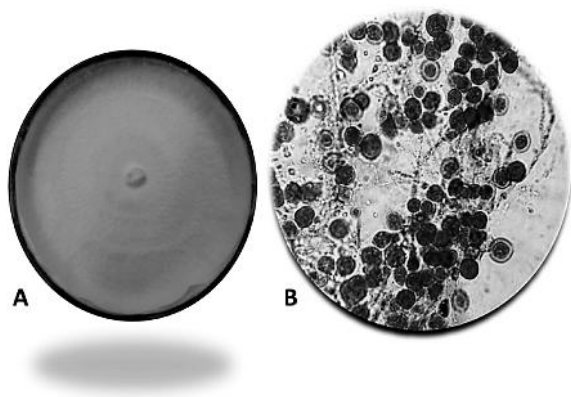
medio RPMI con 10 % de SFB y cultivadas en platos de 96 pozos (100 µL de volumen final por pozo) a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> por 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los polisacáridos (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) (Zhao *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2013). Cada una de las concentraciones se hizo por triplicado.

## Resultados y discusión

### Cepa de *Ganoderma* sp.

En la figura 2 se presenta el cultivo de *Ganoderma* sp., en medio Kirk y las observaciones microscópicas en azul de lactofenol, donde se pudo identificar las hifas septadas y clamidosporas características del hongo.





**Figura 2.** Macroscopía y microscopía de *Ganoderma* sp., A. Micelio (Kirk), B. Clamidosporas (azul de lactofenol, 100X)

### Evaluación de sustratos para la producción de polisacáridos y biomasa de *Ganoderma* sp.

Se ha encontrado que el sustrato incide en la producción de metabolitos fúngicos y entre ellos los polisacáridos, ya que algunas investigaciones han demostrado que parte de la composición química de EPS e IPS dependen en cierta medida del medio de cultivo en el que se incuba el microorganismo, principalmente de la fuente de carbono (Donot et al., 2012; Kagimura et al., 2015).

#### Evaluación de sustratos para la producción de biomasa de *Ganoderma* sp.

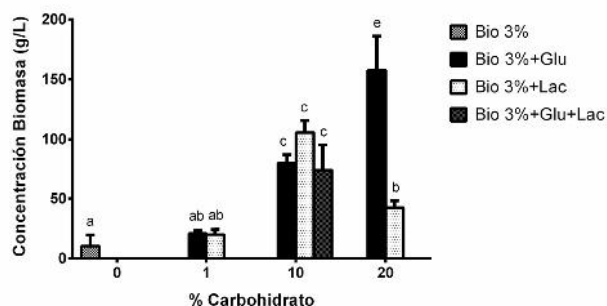
Sustratos utilizados: Bio 3%, Bio 3% + Lactosa (Lac: 1, 10 y 20 %), Bio 3% + Glucosa (Glu: 1, 10 y 20%), Bio 3% + Glucosa + Lactosa (Bio 3% + 10% Gluc + 10% Lac). Los medios de cultivo que generaron mayor producción de biomasa fueron Bio 3% + Glucosa 20% y Bio 3% + Lactosa 10%.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados de cada variable.

Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas y letras diferentes indican que si hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

El sustrato Bio, se utilizó en este trabajo en aras de aprovechar residuos biodegradables que pueden ser utilizados por las enzimas fúngicas, beneficiando la producción de metabolitos, disminuyendo costos de producción, obteniéndose buenos rendimientos y como valor agregado la contribución al cuidado del ambiente.

Al inicio de la fermentación, el medio de cultivo Bio presentó solubilidad parcial en agua, evidenciando cambios durante el proceso de fermentación, observándose una transformación y solubilidad del medio



**Figura 3.** Efecto de la concentración de diferentes sustratos para la producción de biomasa de *Ganoderma* sp.

al transcurrir el tiempo, indicando que el hongo estaba consumiendo el sustrato, comparado con el control sin inocular. En la figura 3 se aprecia que dicho sustrato por sí solo, no es suficiente para alcanzar altas concentraciones de biomasa en menor tiempo, obteniéndose un promedio de 12 g/L a los 10 días de fermentación (figura 3 Bio 3%). Otras investigaciones como la de Fang y Zhong (2002), utilizaron fuentes de carbono convencionales como glucosa al 20, 35, 50 y 65 g/L, encontrando que a la concentración de 35 g/L (3.5 % p/v aprox.) se produjeron 14.1 g/L de biomasa de *G. lucidum* a los 8 días de fermentación. Por otra parte, Tang y Zhong (2002) evaluaron la producción de biomasa con lactosa inicial al 20, 35, 50 y 65 g/L obteniendo un máximo de 14,39 g/L de biomasa de *G. lucidum* a 65 g/L de lactosa (6,5% p/v aprox.) a los 14 días.

En la presente investigación con el medio Bio al 3% sin suplementación con glucosa o lactosa, se produjo 12 g/L y con glucosa o lactosa al 1% se produjeron 20,97 y 20,02 g/L respectivamente a los 10 días; sugiriendo que es posible utilizar sustratos alternativos, económicos y amigables con el ambiente con resultados similares o mejores que los medios convencionales, para la producción de hongos de importancia biotecnológica.

En la figura 3 y en los análisis de comparación de medias mediante el procedimiento de LSD de Fisher, se puede concluir que la concentración de la biomasa es similar al utilizar glucosa o lactosa al 1% y al 10% (tanto independientes como combinadas), siendo la concentración del 10% la que mayor favoreció la producción de biomasa. Otros investigadores como Papinutti (Papinutti, 2010) también demostraron que no hay diferencias significativas en el desarrollo de la biomasa cuando se utiliza glucosa o lactosa como única fuente de carbono a una concentración inicial del 1% p/v.

Adicionalmente, se observó que el sustrato influye de una forma altamente significativa en el crecimiento del hongo. En todos los porcentajes de adición de glucosa y lactosa, hubo un incremento en la concentración



de la biomasa, siendo directamente proporcional en el caso de la glucosa. Al utilizar lactosa, se observó incremento hasta el 10% y de ahí en adelante pareciese haber una inhibición por sustrato. En otras investigaciones se ha demostrado que altas concentraciones de algunos nutrientes inhiben el crecimiento de los hongos en procesos de fermentación (Fang and Zhong, 2002; Chen *et al.*, 2008; Papinutti, 2010).

Pese a que la mayor concentración de biomasa se obtiene al 20% de glucosa (200 g/L), es una cantidad muy alta de sustrato para un proceso de fermentación que se piensa utilizar a escala industrial, donde el objetivo es disminuir costos de producción por lote, utilizar sustratos alternativos y obtener buenos rendimientos (costo-beneficio). Por otra parte, la lactosa al 20 % es poco soluble en agua y desfavoreció el crecimiento del hongo.

### Evaluación de sustratos para la producción de IPS de *Ganoderma* sp.

Sustratos utilizados: Bio, Bio + Lactosa (Lac: 1, 10 y 20 %), Bio + Glucosa (Glu: 1, 10 y 20%), Bio + Glucosa + Lactosa (Bio + 10% Glu + 10% Lac). El medio de cultivo que generó mayor producción de EPS fue Bio + Lac 20%.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados de cada variable.

Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas y letras diferentes indican que si hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

En la figura 4 se puede observar que la producción de EPS es dosis dependiente, presentándose una mayor concentración cuando se adicionó glucosa o lactosa al 20%.

Revisando resultados de otros autores, se encontró que Fang y Zhong (2002) produjeron  $0,43 \pm 0,05$  g/L de EPS de *G. lucidum* a los 6 días de fermentación utilizando glucosa a 20 g/L (2% p/v) como fuente de

carbono, mientras que Tang y Zhong (2002) produjeron  $0,32 \pm 0,04$  g/L de EPS de *G. lucidum* el día 12 de fermentación utilizando lactosa a 20 g/L (2% p/v). En esta investigación con el medio Bio al 3% suplementado con glucosa o lactosa al 1% se produjeron  $0,47 \pm 0,06$  g/L y  $0,40 \pm 0,04$  g/L de EPS respectivamente a los 10 días de fermentación.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se utilizó lactosa al 10% o glucosa en combinación con lactosa al 10%. Al utilizar lactosa o glucosa al 10% y lactosa al 20% se observan diferencias significativas en la producción de EPS, siendo mayor en el caso de la lactosa. Lo anterior demuestra que la producción de EPS es dosis-dependiente con respecto a la adición de estos azúcares tal y como lo han demostrado otros autores (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Lee *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, para producir EPS de una forma viable y económica, se sugiere utilizar una combinación del sustrato Bio con lactosa al 10% (2,65 g/L).

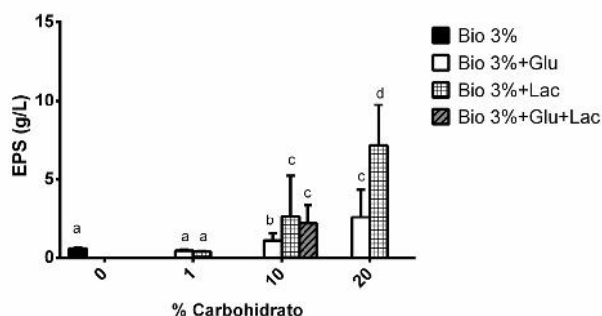
### Evaluación de sustratos para la producción de IPS de *Ganoderma* sp.

Sustratos utilizados: Bio + Lactosa (Lac: 1, 10 y 20 %), Bio + Glucosa (Glu: 1, 10 y 20%), Bio + Glucosa + Lactosa (Bio + 10% Glu + 10% Lac). El medio de cultivo que generó mayor producción de IPS fue Bio + Glu 10% + Lac 10%.

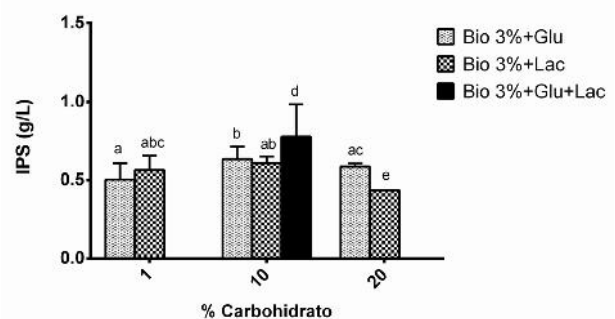
Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los triplicados de cada variable.

Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas entre grupos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas y letras diferentes indican que si hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

En la figura 5 se muestra que no hay diferencias significativas en utilizar la mayoría de los sustratos para la producción de IPS, excepto cuando se utiliza lactosa al 20% y la combinación de lactosa y glucosa al 10%, como se observa en la diferencia de letras sobre las barras.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de diferentes sustratos para la producción de EPS de *Ganoderma* sp.



**Figura 5.** Efecto de la concentración de diferentes sustratos para la producción de IPS de *Ganoderma* sp.

Fan y Zhong (2002) cuando utilizaron glucosa a 20 g/L (2% p/v) como fuente de carbono, produjeron  $0,55 \pm 0,028$  g/L de IPS de *G. lucidum* a los 6 días, mientras que Tang y Zhong (2002) produjeron  $0,92 \pm 0,00$  g/L de IPS de *G. lucidum* utilizando lactosa como fuente de carbono. En la presente investigación se logró producir  $0,5 \pm 0,1$  g/L y  $0,56 \pm 0,09$  g/L de IPS utilizando el medio Bio con glucosa y lactosa al 1% respectivamente a los 10 días de fermentación. Para el caso de la glucosa se obtuvo el mismo resultado que los autores mencionados, utilizando un residuo agroindustrial como sustrato y a la mitad de la concentración de glucosa que ellos utilizaron.

Utilizando el medio Bio con 1, 10, y 20 % p/v de glucosa, la productividad de IPS en relación con la biomasa fue de  $25,7 \pm 2,8$ ;  $8,72 \pm 1,8$ ;  $3,73 \pm 0,76$  mg/ 100 mg de biomasa, respectivamente; y utilizando el medio Bio con 1, 10, 20 % p/v de lactosa se obtuvieron  $33,95 \pm 6,3$ ;  $9,06 \pm 2,2$ ;  $11,05 \pm 2,3$  mg/100 mg de biomasa, respectivamente; indicando que la producción de IPS es inversamente proporcional a la concentración del carbohidrato adicionado, similar a lo obtenido por Lee et al. (2007) en la producción de IPS de *G. applanatum*.

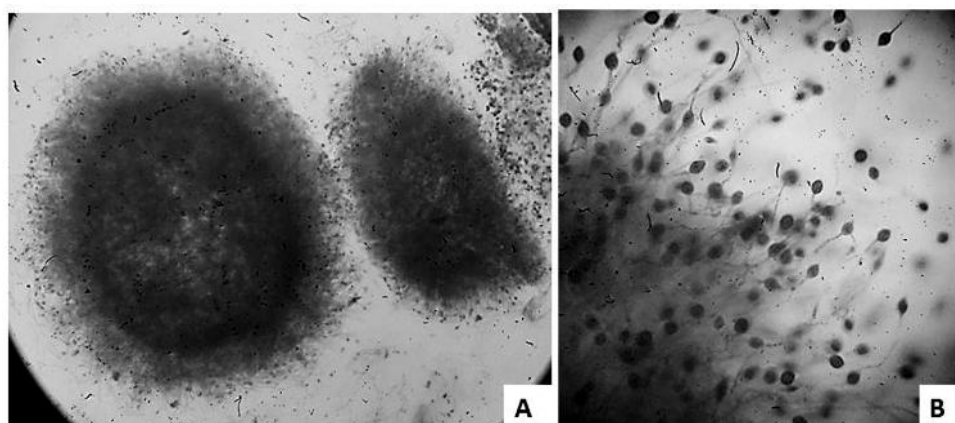
El efecto estimulador de los carbohidratos en la producción de polisacáridos, ya se ha observado en investigaciones previas (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Lee et al., 2007; Papinutti, 2010). De los resultados obtenidos, se puede concluir que la producción de Biomasa y EPS en la mayoría de los casos es dosis-dependiente con respecto al carbohidrato suplementado y en el caso de IPS, no se observan grandes diferencias entre los tratamientos. La mayor producción de IPS se observa al combinar el medio Bio con lactosa y glucosa al 10% ( $0,78 \pm 0,1$  g/L). Esto quiere decir que no necesariamente la producción de biomasa y polisacáridos están directamente relacionadas. Por lo tanto para fines de producción simultánea de biomasa, EPS e IPS, obteniendo los mejores rendimientos y de una forma económica, se decide continuar los

ensayos en biorreactor con el medio Bio suplementado con lactosa al 10%

### Producción de biomasa y polisacáridos a nivel de biorreactor de 5L

A nivel de biorreactor de 5 L se decidió trabajar con lactosa al 10% como sustrato para fomentar tanto la producción de biomasa como de polisacáridos. No se modifican variables porque la producción se realiza con el fin de obtener grandes cantidades de biomasa y polisacáridos para los posteriores análisis de identificación. Se realizaron seguimientos del cultivo en el microscopio cada 2 días, observándose una buena formación y tamaño de pellets, lo cual es muy positivo a la hora de realizar el escalado de una fermentación (figura 6). Al finalizar la fermentación (5 días) se obtuvo una biomasa de 153 g/L. El tiempo de fermentación fue menor que a escala de Erlenmeyer, porque a días posteriores se generaba gran cantidad de polisacárido, cambiando las propiedades reológicas del medio y dificultando la agitación y disminuyendo la transferencia de oxígeno (datos no mostrados).

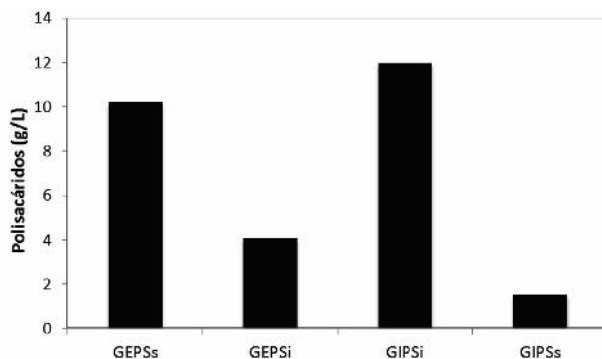
En la figura 7 para *Ganoderma* sp., se observa la cantidad de polisacárido producido por volumen de biorreactor. La mayor cantidad de carbohidratos obtenidos con el medio Bio suplementado con lactosa, se da en el extracto GIPSi y la menor cantidad en GIPSS. La sumatoria total de polisacáridos producidos en el biorreactor fue de 26,9 g/L. Debido a la gran cantidad de biomasa producida, se obtuvo mayor concentración de IPS insoluble, ya que a nivel estructural la pared celular fúngica posee polisacáridos insolubles como la quitina y los glucanos (Chan et al., 2009; Donot et al., 2012). De los EPS liberados al medio, se obtuvo mayor proporción de solubles que de insolubles, probablemente porque el hongo se encontraba en un medio acuoso que favoreció la liberación de sustancias solubles.



**Figura 6.** Seguimiento de los pellets de *Ganoderma* sp., en cultivo sumergido. Micrografías a 40X (A) y 400X (B) con azul de lactofenol.

**Tabla 1.** Porcentaje peso/peso de  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos en los extractos fúngicos. El porcentaje se obtiene con base en el peso seco del extracto crudo.

Muestra	Tipo de glucano	% w/w de beta glucano
GEPSs	Glucano total	39,63
	$\alpha$ -glucano	5,66
	$\beta$ -glucano	33,98
GEPSi	Glucano total	40,39
	$\alpha$ -glucano	5,09
	$\beta$ -glucano	35,30
GIPSi	Glucano total	59,44
	$\alpha$ -glucano	8,21
	$\beta$ -glucano	51,23
GIPSS	Glucano total	9,65
	$\alpha$ -glucano	1,67
	$\beta$ -glucano	7,99



**Figura 7.** Producción de EPS e IPS a nivel de Biorreactor. *Ganoderma* sp.: GEPSs: EPS soluble, GEPSi: EPS insoluble, GIPSi: IPS insoluble, GIPSS: IPS soluble.

Se cuantificaron los  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos para determinar las diferencias entre la concentración de azúcares obtenida por el método del fenol ácido sulfúrico y la cantidad de alfa y beta glucanos presentes en los extractos de acuerdo al método enzimático que es más específico. Como se presenta en la tabla 1 se confirma la presencia de beta y alfa glucanos en los extractos de *Ganoderma* sp. El extracto GIPSi fue el que presentó mayor porcentaje de glucanos totales. En todas las muestras se encontró que de los polisacáridos totales de las diferentes fracciones, en general, entre el 40% y el 60% son tipo glucanos, lo cual es muy satisfactorio, ya que éstos presentan buena actividad biológica (Zhao *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2013; Ruthes *et al.*, 2015).

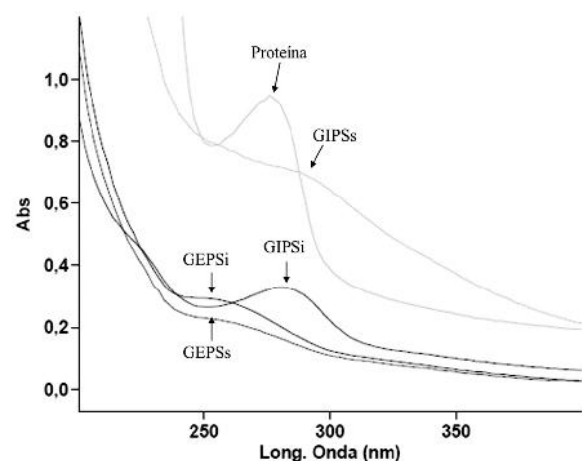
Se encontró que más del 80% de los glucanos totales en todas las muestras son  $\beta$ -glucanos, lo cual es acorde a lo reportado para éstos hongos, debido a que los  $\beta$ -glucanos hacen parte de su pared celular (Ruthes *et al.*, 2015). Esta situación es muy satisfactoria ya que los  $\beta$ -glucanos han sido los más estudiados, aislados y utilizados por sus propiedades bioactivas.

### Análisis por ultravioleta

En la figura 8 se aprecian los espectros ultravioleta de cada uno de los extractos a  $\lambda$  entre 200-400 nm. Se compararon los extractos contra un estándar de proteína, todos a una concentración de 2 mg/mL. Se puede observar que no hay picos característicos de ácidos nucleicos (260 nm), y el extracto GIPSi presentó un pico a 280 nm, lo que permite inferir la presencia de proteínas que pueden estar unidas a polisacáridos, aunque en pequeña proporción por su baja absorción en el espectro. Para la determinación de polisacáridos por el método de fenol-ácido sulfúrico se debe tener en cuenta la pureza de las muestras ya que el método es sensible a altas concentraciones de proteínas. Para purificarlas, es común utilizar el método de Sevag (Staub, 1965), el cual consume mucho tiempo, reactivos y es muy laborioso. Como no se observaron altas concentraciones de proteína y en el presente trabajo el interés primordial es la bioprospección de hongos endógenos de Antioquia y la identificación de metabolitos de interés farmacéutico, se decidió no purificar el extracto, para conocer sus características y no excluir metabolitos posiblemente bioactivos que se pierden en los procesos de purificación.

### Análisis por infrarrojo

La determinación de la configuración anomérica de los monosacáridos fue analizada mediante espectroscopía de infrarrojo (IR). Se analizaron todos los extrac-



**Figura 8.** Espectro ultravioleta a longitudes de onda entre 200-400 nm de cada uno de los extractos.



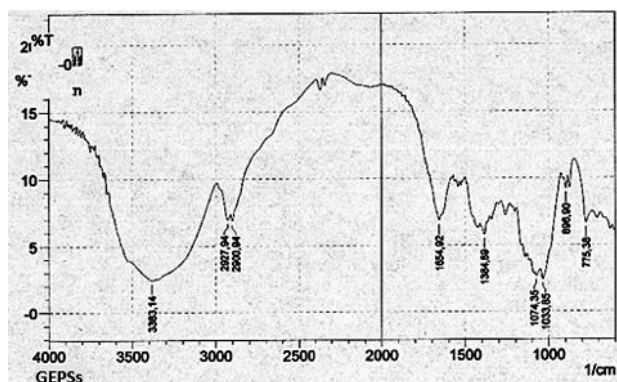


Figura 9. Espectro IR de GEPsS

tos, y se observó que presentaban un patrón similar, por lo cual sólo se presenta el espectro de GEPsS.

El espectro obtenido para el extracto GEPsS presentado en la figura 9 fue el esperado para un  $\beta$ -glucano, mostrando una banda de absorción de alrededor de  $890\text{ cm}^{-1}$  la cual es característica de los enlaces  $\beta$ -glicosídicos. Además el espectro carece de las bandas  $850$  y  $930\text{ cm}^{-1}$  que son bandas normalmente atribuidas a los alfa glicosídicos (Limberger-Bayer, de Francisco *et al.*, 2014).

En este espectro, también se observan bandas a  $1650\text{ cm}^{-1}$  que son características de los enlaces CO-NH, relacionados con péptidos o amino-azúcares (Zechner-Krpan *et al.*, 2010).

### Actividad biológica

Muchos estudios se han concentrado en la producción y bioactividad de los polisacáridos solubles en agua, por ser más fáciles de manejar, cuantificar y caracterizar. Por el contrario, la actividad de los polisacáridos insolubles en agua ha sido poco estudiada (Papinutti, 2010). Es por esto que en este estudio se evalúa la ac-

tividad de polisacáridos solubles e insolubles, ampliando un poco más el conocimiento de éstos últimos.

En los ensayos realizados en las células VERO, no se observó inhibición de crecimiento a la mayor concentración utilizada. Indicando así, que los polisacáridos no poseen actividad citotóxicas en células humanas a las concentraciones evaluadas ( $IC_{50} > 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) (Datos no mostrados) (OPS 2013). En sarcoma de células reticulares de ratón (J774) hubo un cambio de morfología e inhibición de crecimiento en las células a una concentración de  $200\text{ }\mu\text{g/mL}$  (figura 10).

El comportamiento fue similar en todos los extractos.

En esta investigación se observó un efecto dosis-dependiente, similar a lo reportado por otros autores con respecto a la actividad antitumoral de los polisacáridos *in vitro* (Chen *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción de los polisacáridos sobre las líneas celulares cancerígenas no está completamente elucidado (Zhao *et al.*, 2015).

Se puede observar que el efecto es dosis-dependiente y todos los extractos poseen una actividad similar a la del estándar de  $\beta$ -glucano.

En la figura 11 se observa un efecto de los extractos de *Ganoderma* sp., sobre el porcentaje de proliferación de células de sarcoma J774. Se toma como 100% el control de las células sin tratamiento. Casi todos los extractos incluyendo el estándar de  $\beta$ -glucano (Chromadex®), cuya promesa de venta es poseer bioactividad, presentan un comportamiento similar. El efecto es dosis-dependiente, donde a bajas concentraciones no hay efectos en las células de J774 y a concentraciones entre  $100$  y  $200\text{ }\mu\text{g/mL}$  se observa efecto inhibitorio en la proliferación. El extracto que tuvo mayor efecto en las células y presentó un comportamiento similar al estándar ( $IC_{50} = 81,8$ ) fue el GIPSi ( $IC_{50} = 86$ ) (tabla 2). Este extracto presentó un espectro similar en el IR al GEPsS (figura 9), lo cual indica que tiene enlaces

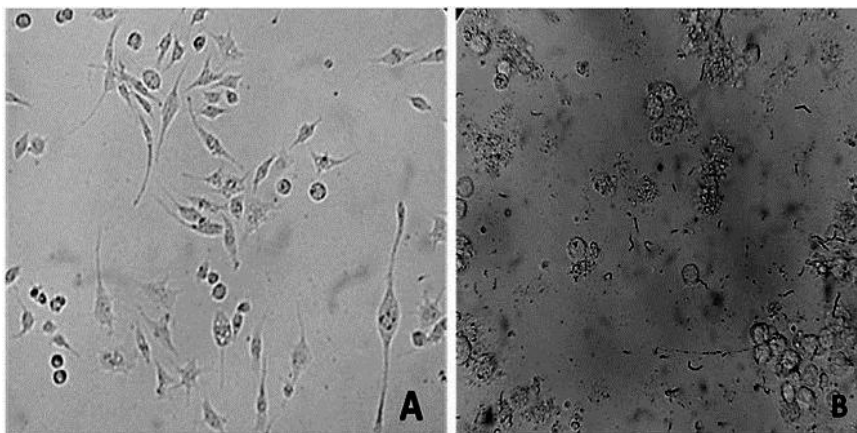
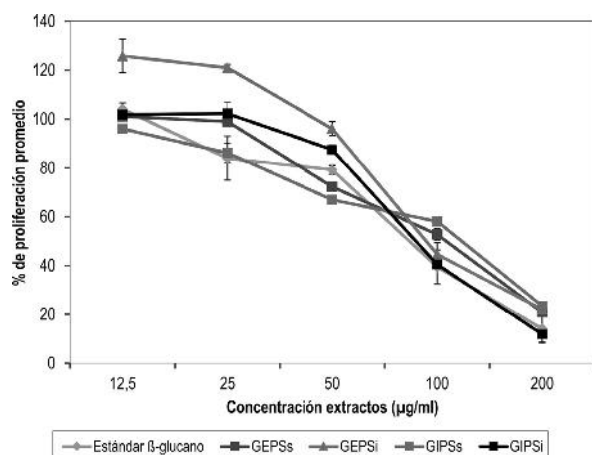


Figura 10. A. Sarcoma de ratón J774 antes del tratamiento con los extractos. B. Sarcoma J774 después del tratamiento con los extractos a  $100$  y  $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ .





**Figura 11.** Efecto de los extractos de *Ganoderma* sp., en el % de proliferación de Sarcoma J774.

característicos de los polisacáridos fúngicos. Adicionalmente, fue el extracto con mayor concentración de azúcares por volumen de biorreactor, al igual que mostró presencia de proteínas en el espectro UV y fue del que se obtuvo mayor porcentaje de glucanos (59%) (tablas 1, 2 y figura 8). Lo anterior indica la importancia de continuar evaluando este extracto, porque con los ensayos realizados hasta el momento posee todas las características de un polisacárido bioactivo. De igual forma, se hace necesario realizar ensayos posteriores con otras líneas celulares donde se evalúe su capacidad antitumoral directa o si su efecto es inmunomodulador como han demostrado otras investigaciones (Feng *et al.*, 2010).

**Tabla 2.** IC50 de los extractos de *Ganoderma* sp.

Muestra	IC50	SD
Estándar	81,8	6,79
GEPSs	105	7,07
GEPSi	88	2,83
GIPSi	86	2,83
GIPSS	106,5	19,09

## Conclusiones

Comúnmente en las investigaciones se utilizan cepas comerciales para la producción de metabolitos de importancia industrial y farmacéutica. En este trabajo, se logró obtener altos rendimientos de biomasa y de polisacáridos a partir de una cepa colombiana de *Ganoderma* sp., aislada en la región Andina tanto a escala de Erlenmeyer como de biorreactor de 5 L.

Con el sustrato Bio utilizado se lograron mayores cantidades de biomasa y polisacáridos que las reportadas en investigaciones que utilizan sustratos convencio-

nales. Adicionalmente, al utilizar suplementos de carbohidratos como la glucosa y la lactosa, se mejoró la producción simultánea de biomasa y polisacáridos, obteniéndose grandes cantidades. Entre los medios evaluados, se eligió como mejor sustrato al medio Bio suplementado con lactosa al 10%.

Este trabajo muestra que es posible utilizar residuos agroindustriales en procesos biotecnológicos como sustratos de bajo costo y que contribuyen a la utilización de estrategias limpias que permitan el cuidado del ambiente y con los que se pueden obtener mayores rendimientos.

Los ensayos de fenol-ácido sulfúrico, ultravioleta, % de glucanos e IR, permitieron detectar la presencia de polisacáridos y algunas proteínas en los extractos, sugiriendo que los hongos endógenos de nuestra región también poseen características y metabolitos importantes a nivel medicinal como los reportados en países orientales. Se encontró que más del 80% de los glucanos totales obtenidos, son β-glucanos, los cuáles han sido ampliamente estudiados por ser moléculas bioactivas.

Adicionalmente se demostró que los extractos de polisacáridos a menos de 200 µg/mL no presentaron toxicidad en líneas celulares VERO y poseen efecto antiproliferativo en células de sarcoma J774, especialmente con el extracto GIPSi que tuvo un efecto similar al generado por estándares comerciales de β-glucanos.

Es necesario realizar posteriores ensayos que permitan caracterizar los polisacáridos aislados y determinar su actividad biológica, especialmente cuando se trata de aprovechar la biodiversidad colombiana.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo de Catalizadores y Adsorbentes y al Grupo de Inmuno Modulación de la Universidad de Antioquia por su colaboración, y a la Universidad de Antioquia y a Colciencias por la financiación de este proyecto (Convocatoria 521-2010 - Banco de Proyectos de Investigación Científica o Tecnológica).

## Referencias

- Arboleda, C. y A. I. Mejía. (2010). Inducción de la actividad lacasa en *Ganoderma* sp., y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista cubana de farmacia*, 44(4), 519-532.
- Arboleda, C., Mejía, A.I.; Franco-Molano, A.E., Jiménez, G.A; Penning, M.J. (2008). Autochthonous white rot fungi from the tropical forest of Colombia for dye decolourisation and ligninolytic enzymes production. *Sydowia*, 60(2), 165-180.
- Benzie, I. F., & Wachtel-Galor, S. (Eds.). (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC Press.
- Bishop, K. S., Kao, C. H., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., & Ferguson, L. R. (2015). From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114, 56-65.
- Chan, G. C., Chan, W.K., Sze, D.M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology*, 10, 2-25.

- Chen, H., Ju, Y., Li, J., Yu, M. (2012). Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 214-218.
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S.F., Li, Y.Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. *Bioresource technology*, 99 (8), 3187-3194.
- Daba, A. S. y O. U. Ezeronye. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 672-678.
- deVere White, R. W., Hackman, R. M., Soares, S. E., Beckett, L. A., & Sun, B. (2002). Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*, 60(4), 640-644.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Fang, Q.-H. y J.-J. Zhong. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37(7), 769-774.
- Feng, Y.L., Li, W.Q., Wu, X.Q., Cheng, J.W., Ma, S.Y. (2010). Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 104-112.
- Fraga, I., Coutinho, J., Bezerra, R.M., Dias, A.A., Marques, G., Nunes, F.M. (2014). Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydrate Polymers*, 111, 936-946.
- Kagimura, F.Y., da Cunha, M.A., Barbosa, A.M., Dekker R.F., Malfatti, C.R. (2015). Biological activities of derivatized D-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 588-598.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., & Farrell, R. L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial technology*, 8(1), 27-32.
- Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J.K., Ka, K.H., Park, S.Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 249-254.
- Limberger-Bayer, V. M., de Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P. J., & Barreto, P. L. (2014). Barley  $\beta$ -glucans extraction and partial characterization. *Food chemistry*, 154, 84-89.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry*, 339(1), 69-72.
- Nie, S., Zhang, H., Li, W., Xie, M. (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1(1), 10-20.
- Papinutti, L. (2010). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource technology*, 101(6), 1941-1946.
- Permiso No. 17. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales-ANLA, Identificación, recolección y clasificación taxonómica y molecular de hongos basidiomicetes productores de enzimas ligninolíticas 22 de mayo de 2012.
- Radicado No. 11-160567. Superintendencia de Industria y Comercio, resolución No. 49744 por la cual se otorga una patente de invención, Bogotá D.C., 22 de Agosto de 2014.
- Ramos M. (1990). Utilidad del análisis térmico en microbiología. Aplicación de las técnicas TG-DTG, DTA y DSC en la caracterización de polisacáridos de paredes fúngicas. España: Universidad de Valladolid.
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., Iacomini, M. (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117, 753-761.
- Organización Panamericana de la Salud-OPS. (2013). Cáncer en las Américas: perfiles de país 2013. Washington, D.C. Recuperado de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=24076&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=24076&Itemid=)
- Staub, A.M. (1965). Removal of Protein-Sevag Method. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 5-6.
- Tang, Y.J. y J.J. Zhong. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1-2), 20-28.
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Sasaki G.I, de Almeida Amazonas, M.A. (2004). Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *Journal of Biotechnology*, 114(1-2), 153-164.
- Zechner-Krpan, V; Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Đaković, S., Filipović-Grčić, J. (2010). Characterization of  $\beta$ -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 189-197.
- Zhao, L; Dong, Y; Chen, G; Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 783-789.

# Remoción anaerobia del colorante azul directo brl en Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) con carbón activado

## Anaerobic removal of the brl direct blue dye in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) with activated carbon

*Christian Zavala-Rivera\**; *Alex Dueñas-Gonza*; *Ronald Huarachi-Olivera\**, \*\*;  
*Ursulo Yapo-Pari*; *Rodrigo Mendoza-Puertas\**; *Ronny Lázaro-Puma\**;  
*Edwin Bocardo-Delgado\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54276

### Resumen

En esta investigación se utilizó el colorante azul directo brl para remoción anaerobia con un consorcio bacteriano aislado de efluentes industriales del Parque Industrial río Seco (PIRS), Arequipa, Perú; en un reactor anaerobio de flujo ascendente UASB con carbón activado. El reactor tuvo una capacidad de 14.4 L con lodos y carbón activado del 40% de volumen, con una carga orgánica de 6 Kg DQO/m<sup>3</sup>·día y un tiempo de retención hidráulica de 1 día con un flujo ascendente. El objetivo fue medir la eficiencia de la remoción anaerobia del colorante en un tiempo de 28 días. Los resultados demostraron un incremento del 41% de los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) de 12894 mg·L<sup>-1</sup> a 21546 mg·L<sup>-1</sup> bajo las condiciones del experimento, con una remoción del 57% de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de 484 mg·L<sup>-1</sup> a 122 mg·L<sup>-1</sup> y una remoción del 87% del colorante azul directo brl de 69.61 mg·L<sup>-1</sup> a 9 mg·L<sup>-1</sup>. Los resultados con el carbón activado granular solamente, demostraron una remoción del 61% del colorante azul directo brl de 70.67 mg·L<sup>-1</sup> a 27.83 mg·L<sup>-1</sup> a los 28 días.

**Palabras clave:** Consorcio bacteriano, remoción, DQO, PIRS, SSV.

### Abstract

In this research the brl direct blue dye was used for anaerobic removal with a bacterial consortium of industrial effluents from Industrial Park Río Seco (IPRS), Arequipa, Peru; in an anaerobic reactor of UASB Upflow with activated carbon. The reactor had a capacity of 14.4 L with sludge and activated carbon of 40% of volume, with an organic load of 6 Kg COD/m<sup>3</sup>·día and a hydraulic retention time of 1 day with an upward flow. The objective was to measure the efficiency of the anaerobic removal of coloring in a time of 28 days. The results showed an increase of 41% of the solids suspended volatile (SSV) 12894 mg·L<sup>-1</sup> up to 21546 mg·L<sup>-1</sup> under the conditions of the experiment, with a removal of 57% of the chemical demand of oxygen (COD) from 484 mg·L<sup>-1</sup> to 122 mg·L<sup>-1</sup> and a removal of 87% of the dye Blue direct the 69.61 brl mg·L<sup>-1</sup> to 9 mg·L<sup>-1</sup>. Results with activated charcoal granular only, they showed a removal of 61% of the dye Blue direct 70.67 brl mg·L<sup>-1</sup> to 27.83 mg·L<sup>-1</sup> at 28 days.

**Key words:** Bacterial consortium, removal, COD, IPRS, SSV.

**Recibido:** febrero 7 de 2015

**Aprobado:** octubre 28 de 2015

### Introducción

El reactor anaerobio de flujo ascendente UASB es el más utilizado en altas tasas de proceso de tratamiento anaeróbico. El UASB es un reactor capaz de retener la alta concentración de microorganismos y tasa de es-

tabilización de residuos y podría ser una opción para generar H<sub>2</sub> biológico. Este reactor presenta características positivas, como permitir una alta tasa de carga orgánica, corto tiempo de retención hidráulico (TRH) y tiene una demanda de energía baja (Metcalf & Eddy, 2003).

\* Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

\*\* Autor responsable de la correspondencia: biomining.ecotoxicology@gmail.com

Existen una gran variedad de diseños de biorreactores aplicados al tratamiento anaerobio de agua residual. Estos pueden ser de tipo reactor de mezcla completa, lecho fijo o inmovilizado, lecho fluidizado o de mamparas. La aplicación de sistemas de alta velocidad, tales como reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) o lecho expandido de lodos granulares (EGSB), en los cuales los tiempos de retención hidráulicos se desacoplan de los tiempos de retención de sólidos, facilitando la eliminación de los colorantes de las aguas residuales (Van Lier, 2001). El reactor anaerobio de flujo ascendente UASB fue diseñado en Holanda por Gatzke Lettinga y sus colaboradores en la Universidad de Wageningen; realizando investigaciones desde 1971 buscando un tratamiento anaerobio de un solo paso para agua residual industrial (Lettinga et al., 1980).

El aspecto más significativo de estos reactores anaerobios es la formación de lodo granular, y consisten fundamentalmente en una mezcla densa de bacterias, que se encargan de llevar a cabo la oxidación de la materia orgánica en metano. La formación de gránulos depende de las características de la corriente residual, la carga de sustrato y los detalles de funcionamiento del reactor, así como la velocidad del fluido ascendente que va de 1 a 2 m·h<sup>-1</sup> (se recomienda que el promedio diario no exceda de 1 m·h<sup>-1</sup>). Se han estudiado UASB con lecho expandido, manejando velocidades de 6 a 12 m·h<sup>-1</sup>. El tiempo de retención hidráulico puede ser de 1 día o menos y la carga contaminante que puede manejar va de 0.5 a 40 kg·m<sup>-3</sup> (Droste, 1997). Una opción factible a la solución del problema de los efluentes textiles es la aplicación de procesos biológicos que degraden los colorantes. El agua contaminada con estos compuestos puede tratarse mediante biorreactores similares a los utilizados convencionalmente, solo mejorando el proceso con la estimulación de microorganismos adaptados a la degradación del colorante de tal manera que sea eficiente su reducción.

Razo-Flores et al., (1997), demostraron que algunos colorantes azoicos pueden ser fuente de carbono, nitrógeno y de energía para microorganismos anaerobios, y por lo tanto pueden ser degradados en reactores biológicos, específicamente ellos utilizaron un reactor anaerobio de flujo ascendente UASB. El carbón activado ha sido utilizado por varios autores como soporte de biopelículas para remover contaminantes en solución acuosa en reactores ya sea de lecho fijo o fluidizado.

En el caso de los tintes azo, el primer paso de la degradación es la ruptura del enlace azo. Este paso es llevado a cabo por una variedad de enzimas citoplasmáticas con baja especificidad por el sustrato llamadas "azorreductasas". En condiciones anóxicas estas enzimas facilitan la transferencia de electrones por medio de flavinas solubles al tinte azo, el cual se reduce (McMullan, 2001). Van Der Zee et al., (2003) demostraron que el carbón activado funciona como mediadores redox en la degradación de colorantes azoicos

acelerando su reducción; el carbón actúa de tal manera que acepta electrones de los microorganismos y los transfiere a la molécula de colorante, a través de los grupos en su superficie.

Los reactores anaerobios como se ha mencionado son convenientes para remover colorantes azoicos, pero la degradación es muy lenta, por lo tanto, es necesario buscar las condiciones adecuadas para acelerar el proceso de reducción, y así sea posible contar con un proceso eficiente y económico.

Por tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la biodegradación anaerobia del colorante azul directo brl en un reactor anaerobio de flujo ascendente UASB con carbón activado.

## Materiales y métodos

### Recolección de las muestras

La toma de muestras de aguas residuales se realizó en los efluentes industriales "Parque Industrial de Rio Seco (PIRS)" ubicado al Noreste del centro de la ciudad de Arequipa, Perú (71°35'59" LO; 16°21'22" LS; 2250 m s.m.m). Las características del agua residual se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características del agua residual usada en el experimento

Parámetros	Valores	Unidades
pH	8.1	
Temperatura	21.4	°C
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	33500	mg/l
Sólidos Totales Disueltos (STD)	12500	mg/l
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	23820S	mg/l
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	12894	mg/l

Los 15 litros de lodos de las aguas residuales del PIRS fueron utilizadas como inóculo para el reactor, luego se alimentó con solución de colorante azul directo brl preparada en laboratorio de Biología Celular del Departamento Académico de la Universidad Nacional de San Agustín (Arequipa, Perú).

### Ensamble del reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) con carbón activado

Se puso en operación un reactor de flujo ascendente del tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), con una capacidad de 14.4 litros fabricado de acrílico,



con un lecho fijo de carbón activado del 40% del volumen de trabajo aproximadamente. El diseño de los reactores se realizó de acuerdo al método basado en la carga orgánica y en el criterio de velocidad de flujo (González & Escamilla, 2006).

El reactor posee un diámetro de tubular de 15 cm, con un caudal mínimo de  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , una carga de  $6 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{día}$  y un tiempo de retención hidráulico (TRH) igual a un día (figura 1).

### Preparación del inóculo y condiciones de mantenimiento

Se tomaron 6 litros de agua residual provenientes de efluentes industriales PIRS con vertimientos domésticos, curtiembres y empresas industriales, presentando un consorcio de microorganismos anaerobios. Este volumen de agua residual se dejó 2 días en un recipiente acondicionado hermético que no permitió el ingreso de aire para permitir el desarrollo del consorcio bacteriano. Al tercer día se agregó 500 mL de lodos anaerobios provenientes de una planta de lodos activados para el tratamiento de efluentes industriales, al octavo día se agregó 50 g de extracto de levadura y 30 g de dextrosa. A partir de este punto se agregó semanalmente  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de extracto de levadura y  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de dextrosa como fuente de carbono e hidrógeno por semana para favorecer la formación de biomasa, además de 2 g del colorante azul directo brl (colorante azoico) ya que fue la molécula de prueba (González & Escamilla, 2006).

En el transcurso de la preparación del inóculo por flujo continuo se monitorearon pH, DQO, Sólidos totales disueltos (STD), Sólidos suspendidos totales (SST) y Sólidos suspendidos volátiles (SSV) cada cuatro días. En esta etapa se evaluaron los parámetros fisicoquímicos principalmente para el acondicionamiento del reactor

UASB realizando evaluaciones periódicas hasta los 32 días (figura 2).

### Operación del reactor UASB

El carbón activado favorece la remoción del colorante debido a los sitios activos y a la superficie que provee para el crecimiento del consorcio bacteriano. El reactor se llenó en un 40% de tal manera que la cama de lodos es un lecho fijo de carbón activado y biomasa del consorcio bacteriano, posibilitando la alimentación del reactor con una bomba peristáltica.

Para inocular al reactor se alimentó por 14 días en recirculación con 20 litros de una solución al 10% del consorcio bacteriano adaptado; esta etapa se denominó etapa de arranque (figura 3). Posteriormente se alimentó en continuo por 28 días con una solución con colorante azul directo brl ( $\text{C}_{30}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ) a  $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , enriquecida con dextrosa y extracto de levadura. Ambas mejoraron la remoción al ser fuente de carbono y nitrógeno para el consorcio bacteriano, además de promover la reacción de remoción esta etapa se denominó etapa de operación (figura 4) (González & Escamilla, 2006). Ambas etapas se realizaron por triplicado.

En la etapa de operación del reactor UASB se evaluó pH, temperatura, demanda química de oxígeno, concentración residual de colorante, sólidos totales disueltos, sólidos suspendidos (SS) y turbidez en los dos componentes del sistema: reactor UASB y efluente tratado. Estos parámetros se evaluaron cada 7 días. La remoción del colorante azul directo brl, se evaluó en cada componente del reactor UASB por medición de la concentración residual del colorante mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 520 nm. (figura 5)

### Adsorción del colorante azul directo brl en carbón activado

Paralelamente se determinó la capacidad de adsorción de  $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de carbón activado granular sobre el colorante de prueba. Para determinar la capacidad de adsorción del carbón activado en solitario se acondicionaron columnas de acrílico con 2 L de solución de azul directo brl a  $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y con el 40 % de volumen de carbón activado granular. Se monitorearon la concentración residual del colorante cada 7 días hasta 28 días de evaluación.

### Análisis de los parámetros

Los parámetros evaluados in situ fueron el pH (pHmetro Portátil Fisher), temperatura (Termómetro Digital Checktemp), sólidos totales disueltos (Equipo Myron L Company). Los parámetros evaluados en laboratorio fueron: Sólidos suspendidos (método fotométrico con un equipo Colorímetro HACH DR/890); sólidos suspendidos volátiles (método gravimétrico con equipo de Bomba de vacío marca Jb Industries Origen EuaUA)

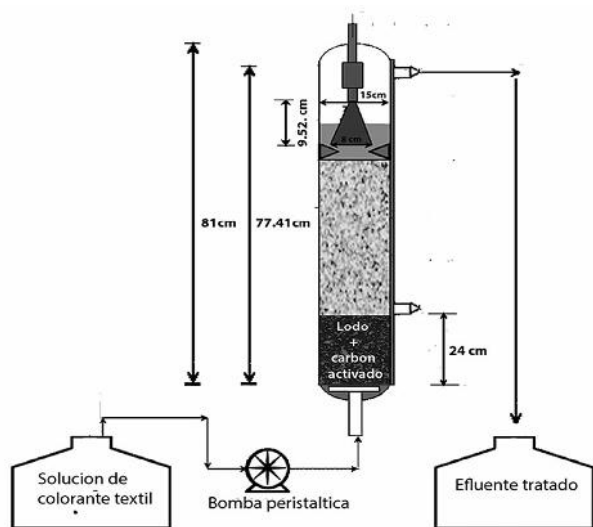
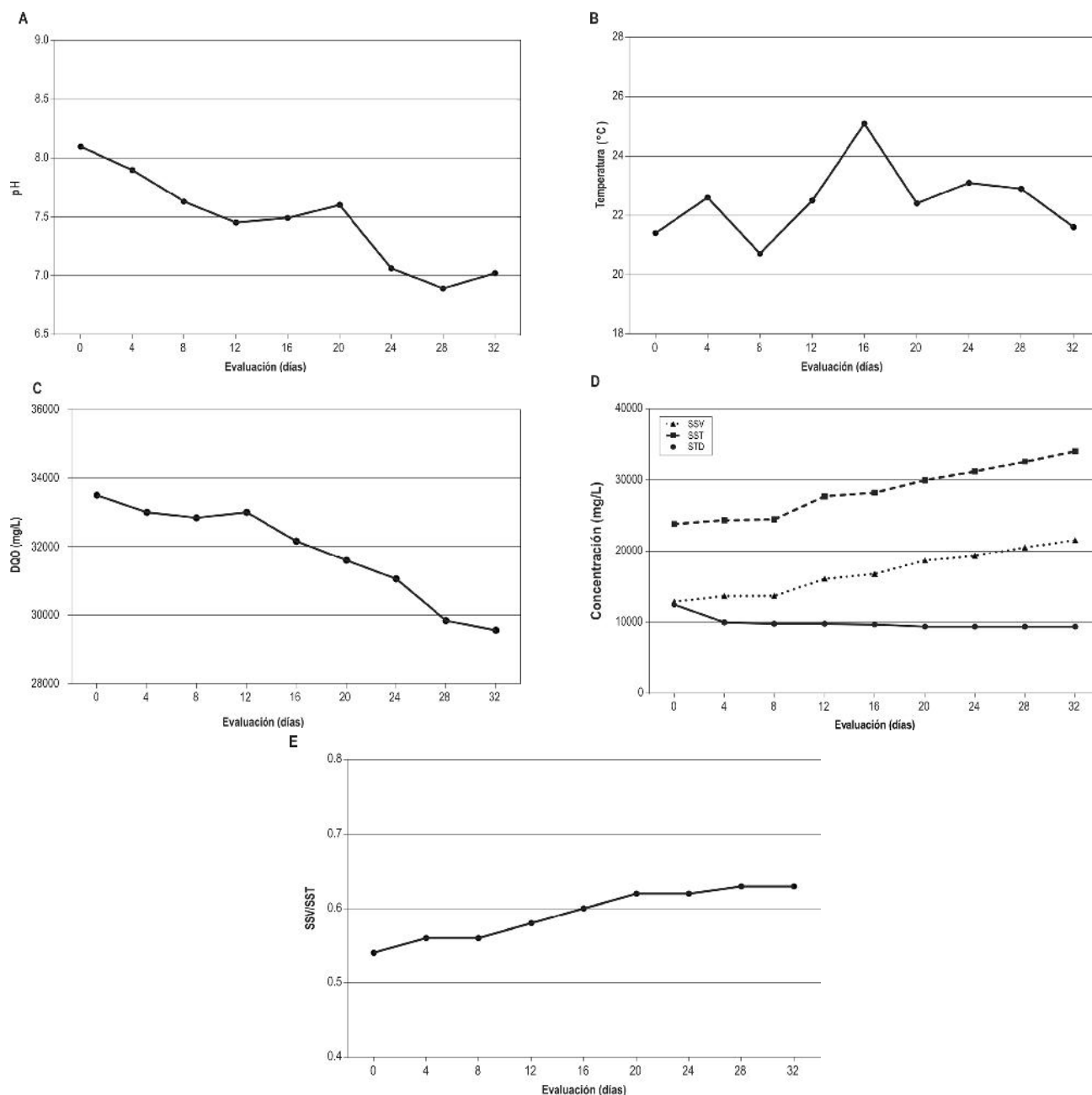


Figura 1. Configuración esquemática del reactor UASB.



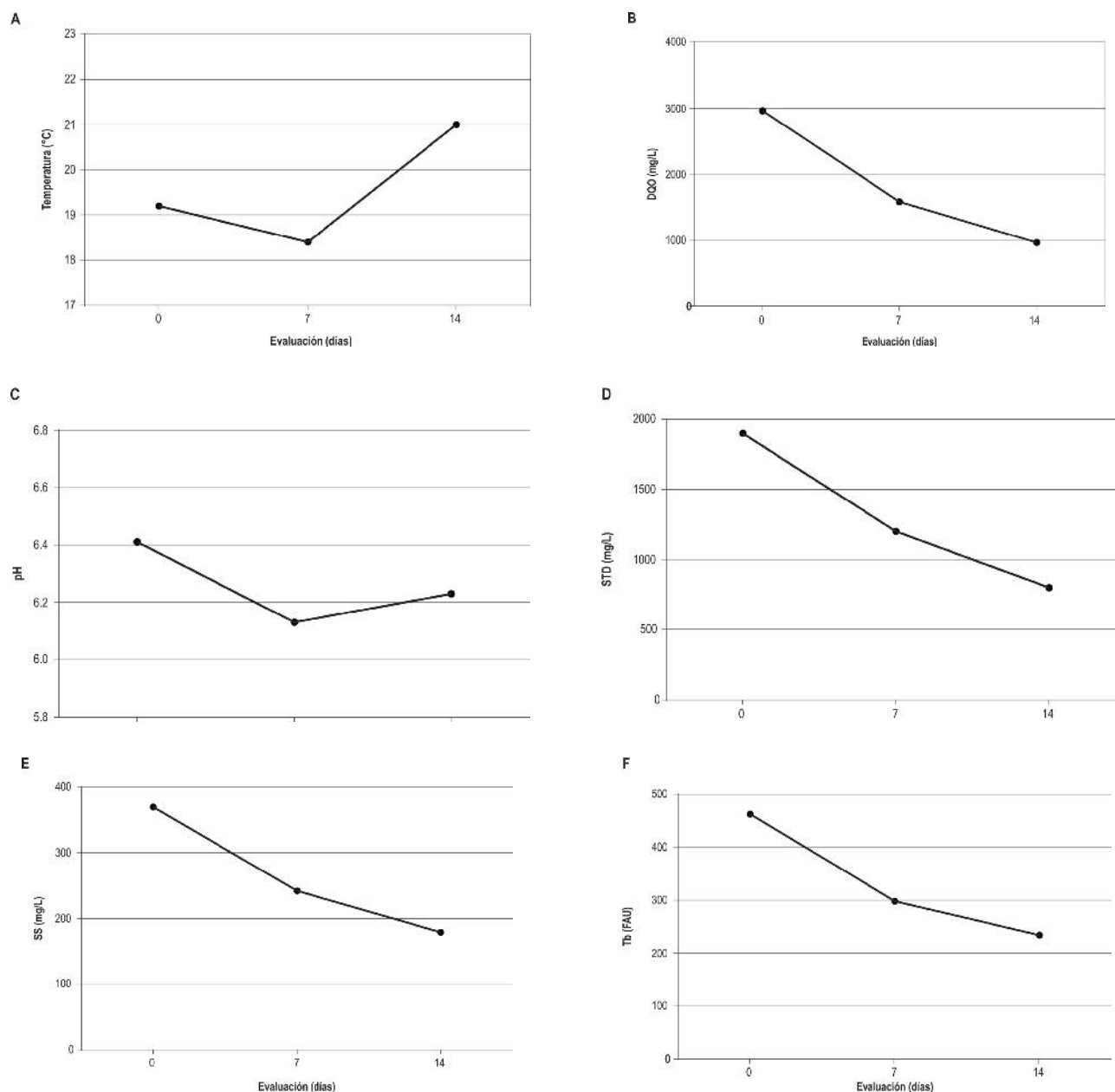
**Figura 2.** Etapa de cultivo del consorcio bacteriano anaerobio con respecto al tiempo. **A.** pH; **B.** temperatura (°C); **C.** demanda química de oxígeno (mg/L); **D.** sólidos suspendidos totales (mg/L); sólidos suspendidos volátiles (mg/L) y sólidos totales disueltos (mg/L). **E.** sólidos suspendidos volátiles (mg/L), sólidos suspendidos totales (mg/L).

(APHA, 1992), concentración de colorante (método absortométrico, espectrofotómetro modelo S - 22 de la marca Kert-Lab), demanda química de oxígeno (método de digestión con dicromato de potasio, equipo colorímetro HACH DR/890) (APHA, 1998).

### Análisis estadístico

Para la evaluación de los parámetros fisicoquímicos en el reactor UASB (upflow anaerobic sludge blanket) se emplearon curvas de tendencia para observar su

evolución en relación al tiempo por cada etapa del sistema, la remoción del colorante azul directo brl en el reactor se empleó la prueba estadística de comparación de ANOVA de una vía, con la prueba de especificidad de Tukey para establecer las diferencias resultantes para el 95% y el 99% de confianza, en la concentración residual del colorante azul directo brl en la etapa operativa. Para la aplicación de las técnicas estadísticas se empleó los paquetes estadísticos SPSS vers. 20, y GraphPad Prism 6.



**Figura 3.** Parámetros fisicoquímicos en la etapa de arranque de reactor UASB para la biodegradación del colorante textil azul directo brl con respecto al tiempo. **A.** Temperatura; **B.** Demanda Química de Oxígeno (DQO); **C.** pH; **D.** Sólidos Totales Disueltos (STD); **E.** Sólidos Suspendido (SS); **F.** Turbidez expresado en FAU (Formazin Attenuation Units = Unidades de Atenuación de Formazin).

## Resultados

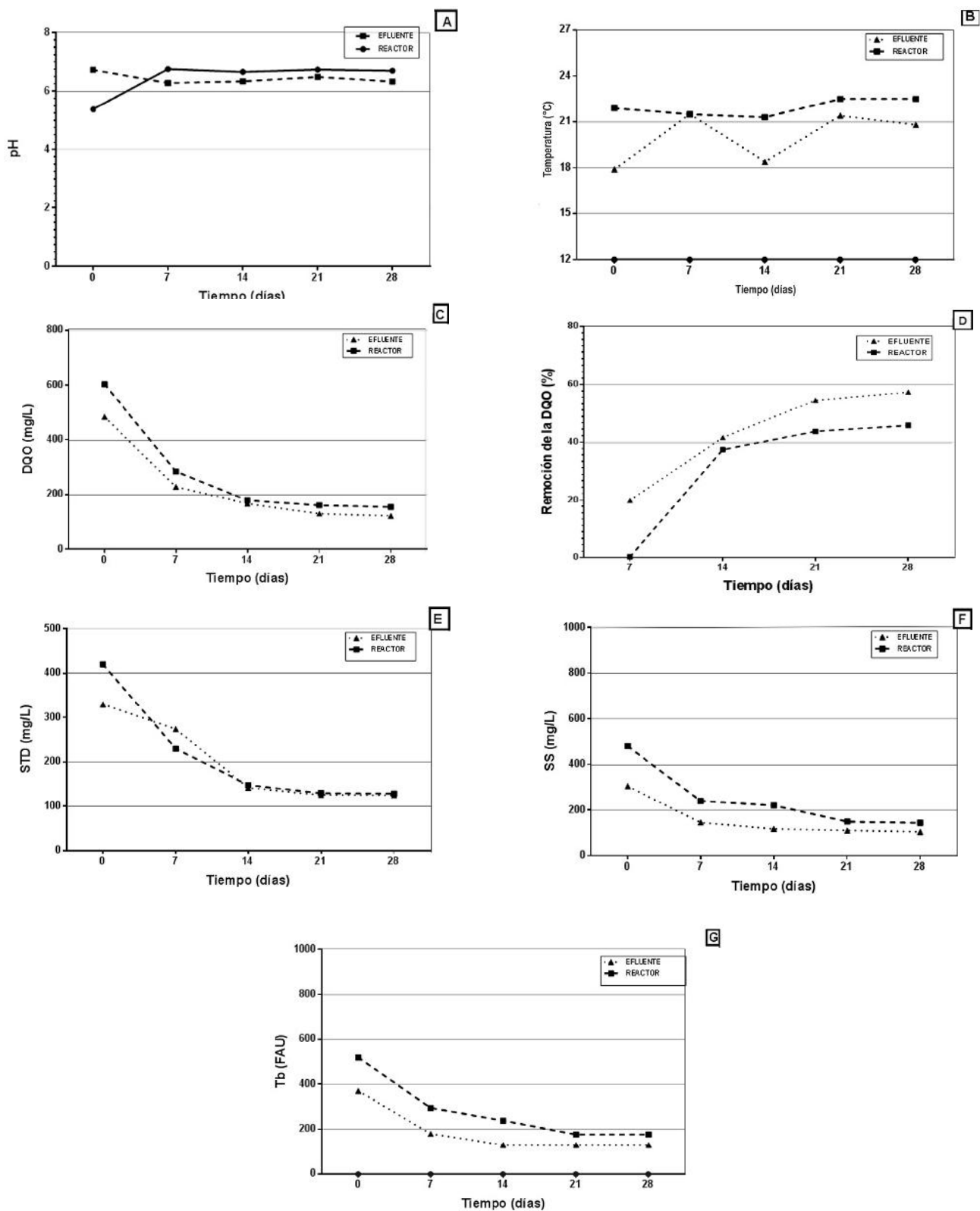
### Etapas de cultivo

Se muestra la disminución importante en los valores de pH hasta los 32 días con un valor de 7.02, mientras que los valores de temperatura alcanzaron un máximo de 25.1°C a los 16 días y una temperatura de 21.6°C a los 32 días, con una disminución de la DQO de 33500 a 29560  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , un aumento en los SST de 23820 a

34079  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y SSV de 12894 a 21546  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , mientras que los STD con una disminución de 12500 a 9400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , la proporción SSV/SST muestra un aumento de 0.54 a 0.63 a los 32 días de evaluación (figura 2)

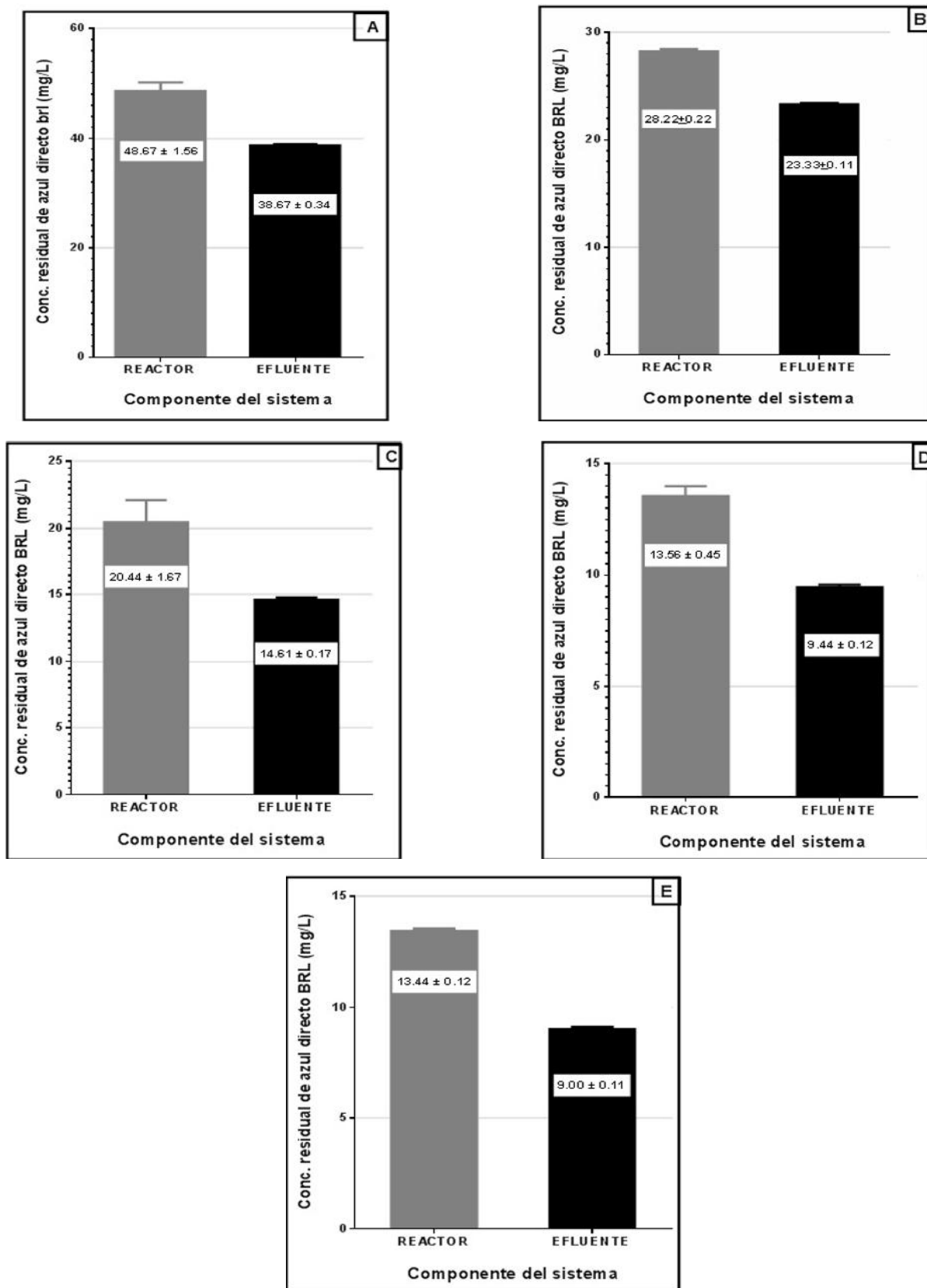
### Etapas de arranque

En esta etapa se evaluaron los parámetros fisicoquímicos para observar el funcionamiento del sistema UASB y la formación de la biopelícula del consorcio



**Figura 4.** Parámetros fisicoquímicos en la etapa operativa de reactor UASB para la biodegradación del colorante textil azul directo brl con respecto al tiempo. **A.** pH; **B.** Temperatura; **C.** Demanda Química de Oxígeno (DQO); **D.** Remoción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO); **E.** Sólidos Suspendedos Disueltos (STD); **F.** Sólidos Suspendedos (SS) **G.** Turbidez expresado en FAU (Formazin Attenuation Units = Unidades de Atenuación de Formazin).





**Figura 5.** Concentración residual del colorante textil azul directo brl en la etapa operativa de reactor UASB. **A.** 0 días de evaluación; **B.** 7 días; **C.** 14 días; **D.** 21 días; **E.** 28 días.

bacteriano, para esta etapa se hicieron evaluaciones periódicas hasta los 14 días. Se muestra los valores de temperatura con un máximo de 21°C, con una disminución en los valores de pH de 6.41 a 6.23, de la DQO de 2960 a 960 mg·L<sup>-1</sup>, de los Sólidos Totales Disueltos de 1900 a 800 mg·L<sup>-1</sup>, de Sólidos suspendidos de 370 a 179 mg·L<sup>-1</sup> y la turbidez de 463 a 234 (FAU) a los 14 días de evaluación (figura 3).

### ***Etapas de operación del reactor UASB***

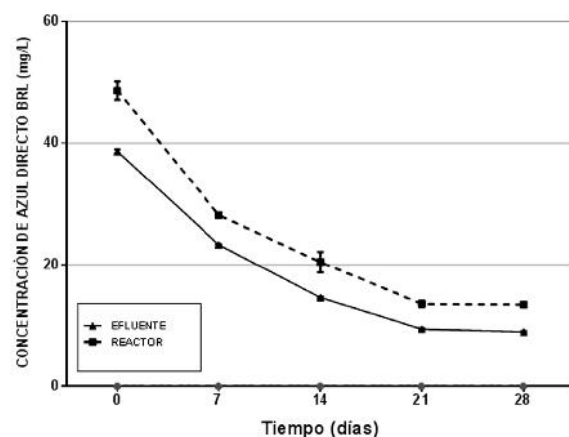
En esta etapa se evaluaron los parámetros fisicoquímicos para el monitoreo del sistema UASB y la remoción del colorante azul directo brl, para esta etapa se hicieron evaluaciones periódicas hasta los 28 días.

El pH=7 hasta los 28 días de evaluación, siendo los valores de pH del efluente los que presentaron menores valores desde los 7 a 28 días con un valor de 6.33 en la última evaluación, mientras que en los valores de temperatura del reactor, las mayores temperaturas se registraron desde los 14 a 28 días de evaluación con 22.5°C en la última evaluación, con un porcentaje de remoción de la DQO del 57% de 484 mg·L<sup>-1</sup> a 122 mg·L<sup>-1</sup> a los 28 días en el efluente del sistema UASB con carbón activado; los valores de los Sólidos Totales Disueltos (STD) hasta los 28 días de evaluación, presenta los valores menores de STD de efluente y el reactor en comparación de los STD de la alimentación, alcanzando un valor de 125 mg·L<sup>-1</sup> en el efluente para la última evaluación, los valores menores de Sólidos Suspendidos (SS) del efluente y el reactor en comparación de los SS de la alimentación en toda la etapa operativa, presenta un valor de SS de 104 mg·L<sup>-1</sup> en el efluente para la última evaluación; los menores valores de turbidez del efluente y el reactor en comparación a la turbidez de alimentación en toda la etapa operativa, alcanzó un valor de 130 FAU en el efluente para la última evaluación (figura 4).

En la etapa operativa del reactor UASB hasta los 28 días de evaluación, la prueba estadística de comparación de ANOVA muestra diferencias altamente significativas (P<0.01) al 99% de confianza en la concentración residual de colorante azul directo brl, en los diferentes tiempos de evaluación, en los componentes del reactor UASB.

### ***Remoción del colorante azul directo brl en el reactor UASB***

Las menores concentraciones del colorante azul directo brl se presentaron en el efluente del reactor UASB, en comparación a la concentración del colorante en el lecho reactor al 99% de confianza; hasta los 28 días de evaluación; presentándose una degradación del colorante, de una concentración inicial de 69.61 mg·L<sup>-1</sup>, hasta 9 mg·L<sup>-1</sup> a los 28 días de evaluación (figura 5.E). representando 87 % de remoción del colorante azul directo brl.



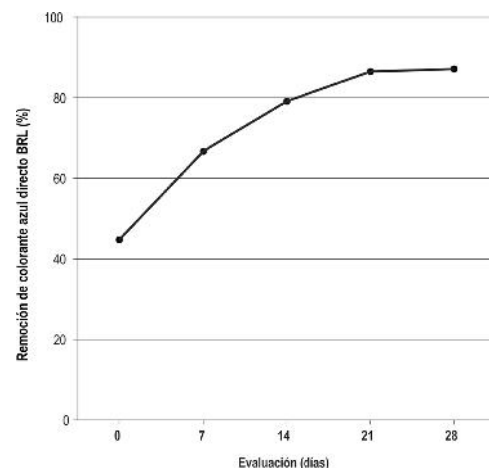
**Figura 6.** Concentración residual del colorante textil azul directo brl en la etapa operativa de cada componente del reactor UASB según tiempo de evaluación.

En la figura 6 se observa una disminución progresiva de la concentración del colorante azul directo brl siendo menores las concentraciones hasta 9 mg·L<sup>-1</sup>, en el efluente en comparación al reactor hasta los 28 días.

En la figura 7 se observa un mayor porcentaje de remoción en el efluente del sistema UASB hasta la última evaluación, siendo la remoción inicial de 44.76%, a los 7 días fue 66.67%, un 79.13% de remoción se mostró a los 14 días, mientras que a los 21 días de evaluación se presentó 86.51% de remoción, finalmente se presentó el 87.14% de remoción del colorante a los 28 días de evaluación.

### ***Remoción del colorante azul directo brl en la columna con carbón activado granular***

La concentración residual del colorante azul directo brl por efecto solamente de carbón activado granular,



**Figura 7.** Porcentaje de remoción del colorante textil azul directo brl según tiempo de evaluación.

presentó una remoción del 61%, con valores de  $70.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $27.83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , lo cual indica que el carbón activado utilizado en los ensayos de adsorción presenta una mediana eficiencia en la remoción del colorante, ya que comparado con el reportado por Conceição (2013) para azul índigo de 99.6% para  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de carbón activado resulta ser mucho menor, esto puede deberse a la diferente composición del colorante.

## Discusión

En la etapa del cultivo se muestra un incremento de los sólidos suspendidos volátiles 12894 a  $21546 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  superior al reportado por (González & Escamilla, 2006), donde tomaron una muestra de carbón activado usado y se determinó que el contenido de sólidos suspendidos volátiles fue de  $159.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , que corresponde a la cantidad de biomasa que se fija al carbón como biopelícula, lo que indica una formación adecuada de la biopelícula de bacterias anaerobias provenientes de efluentes industriales bajo las condiciones del experimento; ya que se ha reportado la obtención de bacterias o consorcios microbianos capaces de remover colorantes, debido a la adaptación de los organismos, al estrés ambiental y a la presión evolutiva debido a las condiciones del efluente (Yu *et al.*, 2001; Dafale *et al.*, 2008; Kalyani *et al.*, 2008).

En la fase de operación se muestra una remoción de la DQO del 57% de  $484 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $122 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a los 28 días de evaluación similar al reportado por González & Escamilla, (2006) en la remoción del  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  del colorante rojo reactivo hasta los 20 días de evaluación que fue del 56%, esto se debe a que a altas proporciones de biomasa en el agua ocasionan un aumento en la DQO e inhiben el efecto de la interacción del carbón activado con los microorganismos (González & Escamilla, 2006).

El porcentaje de remoción del colorante azul directo brl obtenido en reactor UASB con carbón activado fue de 87 % a los 28 días, por encima del reportado por González & Escamilla, (2006) en un sistema UASB para la biodegradación de  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  del colorante rojo reactivo hasta los 20 días de evaluación en que lograron la remoción del colorante en 85%, sin embargo ambos porcentajes de remoción fueron menores a los obtenidos por (Toorisaka, *et al.*, 2005) donde se obtuvo el 90% de la eficiencia en la decoloración en el sistema UASB con  $0.627 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de colorante azul de metileno demostrando que contribuye a aumentar la reducción del colorante debido a la interacción entre el carbón activado y los microorganismos; Toorisaka, *et al.*, (2005) reportan una concentración menor a  $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de la DQO, el efecto importante del carbón activado se debe a que la primera etapa de remoción de colorante es la adsorción sobre carbón activado y biosorción sobre las células del consorcio, además del inicio de la reacción bioquímica, al usar mayor cantidad de carbón activado, hay mayor superficie para la

adsorción y también para la formación de biopelícula. Sin embargo Conceição *et al.*, (2013) obtuvo el 97% de remoción de  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de colorante azul índigo usando la arcilla de cerámica como material adsorbente, con una concentración de  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de adsorbente, lo que indicaría, que con el uso de arcilla de cerámica se presentan resultados óptimos en comparación al carbón activado y puede ser usado como material adsorbente como una post-unidad de tratamiento para la eliminación de colorantes. Sponza & Işik, (2005) en su trabajo sobre decoloración del tinte Direct Black 38 bajo condiciones anaerobias obtuvo una eficiencia del 97% en la decoloración y una eficiencia del 70% en la remoción de la DQO. Chinwetkitvanich *et al.*, (2000) en decoloración anaerobia de reactivo de efluentes de tintes por sistema UASB con tapioca como co-sustrato obtuvo una eficiencia del 63% en decoloración. Brás *et al.*, (2005) en decoloración por tintes azoicos en sistema UASB obtuvo una eficiencia de 85-92% con una remoción del DQO de 92% a  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de tinte. Işik & Sponza (2005) realizaron un trabajo sobre efecto de la alcalinización en sistema UASB a través de la decoloración tinte azoico rojo de Congo obteniendo una eficiencia en la decoloración del 100% y una eficiencia en la remoción del DQO del 82-90%. Senthilkumar *et al.*, (2011) en un trabajo sobre tratamiento de aguas residuales con tintes de textiles usando el sistema UASB con aguas residuales con sagú como co-sustrato obtuvieron una decoloración de 91.3% y una remoción máxima de la DQO del 88.5%. O'Neill *et al.*, (2000) en un tratamiento combinado aerobio-anaerobio fue utilizado para tratar aguas residuales de industrias textiles usando el sistema UASB obteniendo una remoción de la DQO del 88% y una decoloración máxima del 70%. Manu & Chaudhari, (2002) en un estudio sobre decoloración de tintes comerciales azoicos obtuvo una remoción máxima de la DQO del 95% y una decoloración mayor al 99%. Karataş & Dursun. (2007) en su trabajo sobre bio-decoloración del tinte azoico (reactive Black 5, RB 5) obtuvo una decoloración completa del 99%.

Las estructuras químicas de los colorantes resultan a menudo demasiado complejas para utilizar un tratamiento simple, por lo que generalmente se utilizan consorcios microbianos con la capacidad de degradar colorantes obteniendo altas eficiencias de depuración. Muchos de estos consorcios no están completamente caracterizados y se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo la degradación. El desarrollo de estas tecnologías se basan en técnicas convencionales, sin tomar en cuenta que la actividad biodegradativa de un grupo de organismos no depende de una sola especie, sino que generalmente es resultado de la acción conjunta de la diversidad metabólica presente en el medio (Cortazar *et al.*, 2012).

El valor de pH del efluente a los 28 días de evaluación fue de 6.33 presentando un porcentaje de remoción del colorante azul directo brl del 87% dentro del ran-

go de remoción obtenido por González & Escamilla, (2006) para el colorante rojo lanasol en el que se obtuvo los porcentajes de remoción de la DQO de 54 a 93% en el estudio sin control de pH, sin embargo el porcentaje de remoción en la misma investigación con control de pH a 5 fue de 85.62 a 96.79%.

La concentración residual de colorante azul directo brl por efecto del carbón activado de 125 mg•L<sup>-1</sup>, presentó una remoción de 70.67 a 27.83 mg•L<sup>-1</sup> con porcentaje de remoción del 61.37 %, lo cual indica que el carbón activado utilizado en los ensayos de adsorción presenta una mediana eficiencia en la remoción del colorante, comparado con los trabajos de Conceição, (2013) para azul índigo de 99.6% para 150 mg•L<sup>-1</sup> de carbón activado.

## Conclusiones

El porcentaje de la remoción de la DQO fue de 57%, el colorante azul directo brl en el reactor UASB con carbón activado fue removido en 87 % hasta 28 días evaluación.

El porcentaje de remoción del colorante azul directo brl solamente del carbón activado fue del 61% del colorante a los 28 días.

## Referencias

- APHA, (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- APHA, (1998). Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> ed. American public health association American water works association/water environment federation, Washington DC, USA.
- Brás, R., Gomes, A., Ferra, M.I.A., Pinheiro, H.M., Gonçalves, I.C. (2005). Monoazo and diazo dye decolourisation studies in a methanogenic UASB reactor. *Journal of Biotechnology*, 115, 57-66.
- Cortazar, A., Gonzalez, C.A., Coronel, C., Escalante, J.A., Castro, J., Villagómez, J.R. (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Revista Universidad y Ciencia*, 28(2), 187-199.
- Chinwetkitvanich, S., Tuntolvest, M., Panswad, T. (2000). Anaerobic decolorization of reactive dyebath effluents by a two-stage UASB system with tapioca as a co-substrate. *Water Research*, 34 (8), 2223-2232.
- Conceição, V., Bentes, F., Querne de Carvalho, K. (2013). Treatment of textile effluent containing indigo blue dye by a UASB reactor coupled with pottery clay adsorption. *Acta Scientiarum. Technology: Acta Sci. Technol.*, 35(1), 53-58.
- Dafale, N., Rao, N.N., Meshram, S.U., Wate, S.R. (2008). Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium - Biostimulation and halo tolerance. *Bioresource Technology*, 99, 2552-2558.
- Droste, R.L. (1997). Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment, 800 pages, J. Wiley & Sons (now in 3rd printing and in Chinese and Korean translation).
- González, L., Escamilla, E. (2006). Estudio de la degradación de un colorante azo rojo reactivo en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente In: Retos de la investigación del agua en México, pp.413-428. Edition: Primera, UNAM, Editors: Úrsula Oswald Spring.
- Işık, M., Sponza, D. (2005). Effects of alkalinity and co-substrate on the performance of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor through decolorization of Congo Red azo dye. *Biore-source Technology*, 96, 633-643.
- Kalyani, D.C., Telke, A.A., Dhanve, R.S., Jadhav, J.P. (2008). Eco-friendly biodegradation and detoxification of reactive red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 735-742.
- Karataş, M., Dursun, S. (2007). Bio-decolourization of azo-dye under anaerobic batch conditions. *J. Int. Environmental Application & Science*, 2, 20-25.
- Lettinga, G., Van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., De Zeeuw, W., Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 699-734.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N.; Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Manu, B., Chaudhari, S. (2002). Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Bioresource Technology*. 82, 225-231.
- Marchant, R. Y Smyth, W.F. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 81.
- Metcalf, L., Eddy, H. (2003). Wastewater Engineering, fourth ed. McGraw Hill, New York.
- O'Neill, C., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Esteves, S., Wilcox, S. J. (2000). Anaerobic-aerobic biotreatment of simulated textile effluent containing varied ratios of starch and azo dye. *Water Research*, 34 (8), 2355-2361.
- Razo-Flores, E., Lijiten, M., Donlon, B., Lettinga, G., Field, J. (1997). Biodegradation of selected azo dyes under methanogenic conditions. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 65-72.
- Senthilkumar, M., Gnanapragasam, G., Arutchelvan, V., Nagarajan, S. (2011). Treatment of textile dyeing wastewater using two-phase pilot plant UASB reactor with sago wastewater as co-substrate. *Chemical Engineering Journal*, 166, 10-14.
- Sponza, D., Işık, M. (2005). Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic/aerobic sequential. *Process Biochemistry*, 40, 35-44.
- Toorisaka, E., Ong, S.A., Hirata, M., Hano, T. (2005). Biodegradation of redox dye Methylene Blue by up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of hazardous materials*, 124(1), 88-94.
- Van Der Zee, F.P., Bisschops, I.A., Lettinga, G., Field, J.A. (2003). Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 402-408.
- Van Lier, J.B, Van Der Zee, F.P., Tan, N.C.G., Rebas, S., Kleerebezem, R. (2001). Advances in high rate anaerobic treatment: staging of reactor systems. *Water Science & Technology*. 44 (8), 15-25.
- Yu, J., Wang, X., Yue, P.L. (2001). Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains. *Water Res.*, 35(15), 3579-86.



# Embriogénesis somática en el cultivar de plátano 'FHIA – 25' (AAB) a partir de ápices meristemáticos

## Somatic embryogenesis in plantain cultivar 'FHIA – 25' (AAB) from meristem tips

*Dayana Rodríguez González\**, *Jorge López Torres\*\**, *Aymé Rayas\*\*\**, *Nery Montano Pérez\*\*\*\**,  
*Arletys Santos Pino\*\**, *Milagros Basail Pérez\*\**, *Damicela Reynaldo Alvarez\*\*\*\**,  
*Yoel Beovides García\*\*\**, *Víctor Medero Vega\*\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.45711

### Resumen

El cultivar de plátano 'FHIA – 25' (AAB), posee excelente rendimiento y alta resistencia a "Sigatoka negra", pero con la limitante del bajo contenido de azúcar en su fruto, lo cual hace que sea necesario disponer de un método de regeneración de plantas a nivel celular como la embriogénesis somática, que se complementa a técnicas biotecnológicas de transformación genética para mejorar la calidad del fruto. El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer una metodología de regeneración vía embriogénesis somática a partir del explante inicial ápices de brotes axilares establecidos directamente en medio de cultivo líquido. Se obtuvieron suspensiones celulares embriogénicas homogéneas a partir del explante antes mencionado. Se lograron las mayores tasas de multiplicación a la densidad celular de 3,0%. La incubación de los embriones somáticos durante 30 días en el medio de cultivo de maduración permitió incrementar la germinación de los mismos. Durante la fase de aclimatización las plantas provenientes de los embriones somáticos, así como las plantas regeneradas por organogénesis, mostraron un alto porcentaje de supervivencia (98 y 97 %, respectivamente), sin la presencia de variación somaclonal.

**Palabras clave:** embrión somático, *Musa*, suspensiones celulares.

### Abstract

Plantain cultivar 'FHIA – 25' (AAB) shows high yielding qualities and high resistance to Black Sigatoka disease, but its sugar content in the fruit is low, so a regeneration method at cell level is necessary, such as somatic embryogenesis supported by biotechnological tools to improve fruit quality. This work was performed with the aim of establishing a plant regeneration method via somatic embryogenesis using initial explants of shoot apices from axillary buds in liquid culture medium. Homogenous embryogenic cell suspensions were obtained from mentioned explants. The highest cellular multiplication rates were achieved at 3,0% density. The incubation of somatic embryos during 30 days in the maturation culture medium permitted to increase germination. During the acclimatization stage, plants regenerated from somatic embryos, as well as plants from organogenesis, showed a high survival percentage (98 and 97 respectively), without somaclonal variation.

**Key words:** somatic embryo, *Musa*, cell suspensions.

**Recibido:** diciembre 10 de 2014

**Aprobado:** septiembre 21 de 2015

\* Lic. en Biología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba.  
E-mail: tculture.biotech@inivit.cu

\*\* Investigador Titular. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT.Cuba

\*\*\* Investigador Auxiliar. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT.Cuba

\*\*\*\* Técnico de Investigaciones. Laboratorio de Biotecnología. INIVIT.Cuba

## Introducción

Los bananos (*Musa* spp.) constituyen una fuente importante de alimento para gran parte de la población mundial, y se cultivan en el mundo más de cinco millones de hectáreas con una producción anual de 106 714 204.76 toneladas (FAO, 2015).

En Cuba, se producen anualmente unas 150 000 toneladas (FAO, 2015) y su cultivo contribuye a lograr la estabilidad de productos alimentarios en el mercado, debido a su capacidad de producir durante todos los meses del año, sus arraigados hábitos de consumo, así como su diversidad de usos (Rodríguez, 2000).

Sin embargo, a partir de noviembre de 1990, se detectó en los cultivos de *Musa* la aparición de la enfermedad conocida como “Sigatoka negra”, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que afectó severamente las áreas dedicadas a la siembra de plátanos y bananos susceptibles a esta enfermedad, las cuales fueron reemplazadas progresivamente por otros cultivares (Sánchez et al., 2002). Una opción para este problema ha sido la introducción de híbridos de bananos y plátanos más resistentes o tolerantes a esta enfermedad, procedentes de la Federación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA). Dentro de ellos, el cultivar de plátano ‘FHIA – 25’ (AAB) posee excelente rendimiento y es altamente resistente a “Sigatoka negra”, pero su fruto muestra la limitante del bajo contenido de azúcar, inherente a las limitantes que posee la mejora clásica debido a que los principales cultivares comerciales son estériles, no producen semillas y la mayoría son partenocárpicos (Stover y Simmonds, 1987). Ante este panorama es prioritario disponer de un método de regeneración de plantas a nivel celular, como la embriogénesis somática, que se complementa a técnicas biotecnológicas de transformación genética para mejorar la calidad del fruto (Kamle et al., 2011).

La embriogénesis somática (ES) es una vía de morfogénesis en la que ocurre la formación de un embrión a partir de una célula somática o grupos de ellas. El embrión no es producto de la fusión de gametos (Merkle et al., 1995) y la misma se fundamenta en la teoría que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas (Steward et al., 1958).

La embriogénesis somática constituye una herramienta auxiliar a las técnicas biotecnológicas para la mejora genética de los bananos (Perea, 2001; Escalant y Jain, 2004), además de permitir obtener producciones superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual hace que este método sea potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Ibaraki y Kurata, 2001).

Tomando en consideración los antecedentes descritos, se desarrolló la investigación con el objetivo de establecer una metodología de regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir del explante inicial de ápices de brotes axilares.

## Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. El mismo se llevó a cabo durante el período comprendido entre enero de 2012 y febrero de 2013.

Se utilizó el cultivar ‘FHIA – 25’ procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT, por su interés en el Programa de Mejoramiento Genético del Plátano en Cuba. Los explantes para establecer los cultivos asépticos *in vitro*, fueron ápices obtenidos de plantas en floración, previamente seleccionadas con buen estado fitosanitario. Se seleccionaron hijuelos tipo “espada”, con una altura entre 25 y 30 cm, los cuales fueron llevados a condiciones semicontroladas en un umbráculo cubierto por una malla plástica (Zarán), que logra una reducción de la intensidad luminosa del 70% durante esta etapa. El riego se realizó por microaspersión mediante sistema Microjet con una frecuencia de seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno. Se garantizó una humedad relativa del 85–90%. Transcurridos 45 días, se realizó la desinfección de los explantes y su establecimiento *in vitro* en el medio de cultivo propuesto por López (1999). Los materiales fueron incubados durante 15 días en una cámara de cultivo con temperatura de  $27 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e iluminación artificial, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de  $62\text{--}68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y ocho horas de oscuridad. Transcurrido este período, a partir de cada ápice meristemático, se obtuvieron grupos de brotes que se separaron para subcultivarlos en cuatro ocasiones con intervalos de 21 días, en el medio de cultivo de establecimiento P5-0,2, propuesto por López (2006) y condiciones similares de temperatura e iluminación, para disponer de la cantidad de material vegetal necesario para realizar el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas (SCE).

### Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes axilares

Para el establecimiento de las SCE los ápices de brotes axilares fueron colocados en cinco matraces Erlenmeyer de 100 mL (con ocho explantes cada uno) que contenían 20 mL de medio de cultivo líquido ZZ propuesto por Dheda et al. (1991) y modificado por (Schoofs, 1997) (tabla 1). Cada Erlenmeyer utilizado constituyó una réplica, referido en adelante como suspensión celular 1, 2 y 3.

Los matraces Erlenmeyer se colocaron en un agitador orbital (zaranda), a 90 rpm y bajo el régimen de 16 horas de luz, de  $62\text{--}68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de flujo de fotones fotosintéticos y 8 h de oscuridad.

Durante los dos primeros meses los cambios de medios de cultivo se realizaron cada 7 días de cultivo y consistieron en la renovación del 100% del medio de cultivo ZZ, al tercer mes estos cambios se realizaron

cada tres días renovando el 50% del medio. Al cuarto mes fueron tomados los glóbulos meristemáticos formados y se subcultivaron cada 7 días renovando el 90% del medio de cultivo viejo.

Transcurridos 135 días, se evaluó el número de agregados embriogénicos formados por mL de cultivo. Los conteos se efectuaron en cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad. Para esto se tomaron cinco muestras de suspensiones celulares de 1,0 mL de volumen por cada Erlenmeyer. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de Dunett C. Se consideró significativo si  $p \leq 0,05$ .

Una vez establecidos, los cultivos celulares fueron tamizados a través de filtros de malla metálica, con un diámetro de poro de 500  $\mu\text{m}$ . Estos filtrados constitu-

yeron las suspensiones celulares utilizadas en una secuencia de cuatro experimentos realizados: 1) Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas; 2) Formación de los embriones somáticos; 3) Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación y, 4) Conversión a plantas de los embriones somáticos. Estos experimentos se describen a continuación.

### Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas

Una vez establecidas las suspensiones celulares, se evaluó el efecto de tres tratamientos que correspon-

**Tabla 1.** Medios de cultivos utilizados según la etapa de desarrollo de la embriogénesis somática  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Medios de cultivo	Preparación del explante (Multiplicación) P5-0,2	Callos y suspensiones celulares ZZ	Formación de embriones RD1	Maduración de embriones ME	Germinación de embriones GE
Macro-Elementos	MS	MS ½	MS ½	MS	MS
Micro-Elementos	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS	MS
Ácido Ascórbico <sup>a</sup>	10	10	10	10	10
Myo-inositol <sup>a</sup>	100	-	100	100	100
AIA <sup>a</sup>	0,17	-	-	2	2
2,4-D <sup>a</sup>	-	1	-	-	-
BAP <sup>a</sup>	2,25	-	-	-	0,5
Zeatina <sup>a</sup>	-	0,22	-	0,22	-
Ancimidol <sup>a</sup>	0,2-0,4	-	-	-	-
Sacarosa <sup>a</sup>	30 000	30 000	30 000	45 000	30 000
Phytigel <sup>b</sup>	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

<sup>a</sup> = concentración en  $\text{mg.L}^{-1}$ ; <sup>b</sup> = concentración en  $\text{g.L}^{-1}$   
MS: Murashige y Skoog (1962)

dieron a densidades de inóculo inicial (3,0; 6,0 y 9,0%) con el objetivo de evaluar la influencia de la densidad con relación a la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares y determinar el valor mínimo de inóculo que permitiera su correcta multiplicación. Se midió cada tres días el incremento o multiplicación celular de cada tratamiento, según la metodología de evaluación propuesta por Schoofs (1997) para medir el VCS (Volumen de célula sedimentada). Para ello se emplearon cinco matraces Erlenmeyer de 25 mL de capacidad por cada densidad evaluada (3,0; 6,0 y 9,0%). El medio y las condiciones de cultivo fueron similares a los descritos para el establecimiento de las suspensiones celulares (tabla 1), pero sin renovar el medio de cultivo durante los 24 días que duró el experimento. Los cultivos celulares fueron observados al microscopio óptico, para determinar la vitalidad celular mediante fluorescencia (Widholm, 1972).

Para el análisis del crecimiento de las SCE se utilizó el modelo de regresión no lineal de Gauss mediante el programa de ajuste de curvas, CURVE EXPERT 1,3.

### **Formación de los embriones somáticos**

Con el objetivo de lograr la formación de los embriones somáticos, las SCE obtenidas se ajustaron al 12% de densidad celular según la metodología propuesta por López (2006) y se cultivaron en el medio de formación de embriones RD1 (Dhed'a *et al.*, 1991).

Se emplearon cinco placas Petri por cada suspensión celular estudiada. A cada placa Petri se le colocaron sobre el medio de cultivo cuatro mallas de poliestireno con un tamaño de 1,0 cm<sup>2</sup> y poros de 100 µm. Luego se añadieron 200 µL al 12% de VCS mediante una micropipeta con la punta cortada.

El número de embriones somáticos formados se evaluó a los 45 días de cultivo. Para esto se tomó y pesó 0,1 g de materia fresca (gMF) de embriones somáticos formados, los cuales se adicionaron a un vaso de precipitados, que contenía una mezcla de 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel y agua. Posteriormente se vertió la mezcla en una placa Petri, se dejó gelificar y se dividió en cuadrantes para facilitar su conteo, el cual se realizó bajo un microscopio estereoscópico.

Para la comparación de los tratamientos, se aplicó el análisis de varianza y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .

### **Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación**

Con el objetivo de lograr la maduración de los embriones somáticos obtenidos en la etapa anterior, se realizó un experimento en el cual se evaluó el efecto

de tres tiempos de cultivo (15; 30 y 45 días) sobre el medio de maduración de embriones (ME) propuesto por López (2006). Los embriones se colocaron a la densidad de inóculo inicial de 0,5 gMF en cinco placas de Petri por cada variante de tiempo de cultivo estudiado.

Para determinar el estado de maduración de los embriones somáticos, se evaluó su germinación a partir de una muestra de 50 embriones somáticos a los 15, 30 y 45 días de cultivo de cada uno de los tratamientos estudiados. Para ello, se colocaron los embriones somáticos durante 30 días en diferentes placas Petri, que contenían el medio de cultivo de germinación (GE) propuesto por Gómez *et al.* (2000).

Como control del experimento se utilizaron 50 embriones somáticos tomados del medio RD1, a los 45 días de cultivo y sin pasar por el medio de maduración. Las condiciones de cultivo fueron de  $27 \pm 2,0$  °C de temperatura e iluminación artificial, para un régimen de 16 h de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de  $62-68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 8 h de oscuridad.

Para la comparación de los tratamientos, se aplicó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significación de  $p \leq 0,01$ .

### **Conversión a plantas de los embriones somáticos**

Con el objetivo de lograr la conversión de los embriones somáticos en plantas, se evaluó la supervivencia y crecimiento posterior en condiciones ambientales *ex vitro* de las plantas originadas de embriones somáticos, en comparación con plántulas provenientes de la propagación por organogénesis (multiplicadas durante la etapa de formación de los embriones) utilizados como control en la propagación *in vitro*.

Esta fase se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999), en condiciones semicontroladas de humedad relativa del 85-95%, en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), con una densidad de FFF de  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Se utilizaron bandejas de polieturano de 70 orificios, con un volumen de 100 cm<sup>3</sup> de cachaza. Se transfirieron 350 plantas por cada procedencia (embriogénesis somática y organogénesis), con una altura de 4-5 cm y de dos a tres hojas, que fueron plantadas a una profundidad de 1,0 cm.

A los cinco días de plantadas se evaluó el porcentaje de supervivencia y transcurridos 60 días, antes de transferirlas a campo, se evaluó sobre 60 plantas de cada procedencia, las variables fenotípicas: altura de la planta (cm), de la hoja número dos: largo y ancho, el largo del pecíolo (cm), distancia entre las hojas dos y tres (cm), así como las variaciones fenotípicas observadas en toda la población según la metodología propuesta por Sandoval *et al.* (1997).



El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de hipótesis para muestras independientes (T-Student), con un nivel de significación para  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

### *Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes axilares*

Se logró el establecimiento de tres SCE de las cinco iniciadas a partir de los ápices de brotes axilares. Al evaluar el número de agregados embriogénicos en las SCE (tabla 2), no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

**Tabla 2.** Cantidad de agregados embriogénicos presentes a los 135 días de establecidas las suspensiones celulares embriogénicas del cv. 'FHIA - 25'.

Suspensiones celulares	Número de agregados embriogénicos.mL <sup>-1</sup>
Suspensión 1	26,9 x 10 <sup>4</sup>
Suspensión 2	27,6 x 10 <sup>4</sup>
Suspensión 3	27,2 x 10 <sup>4</sup>

Prueba de Dunnett C. ns: No significativo ES $\pm$  0,22

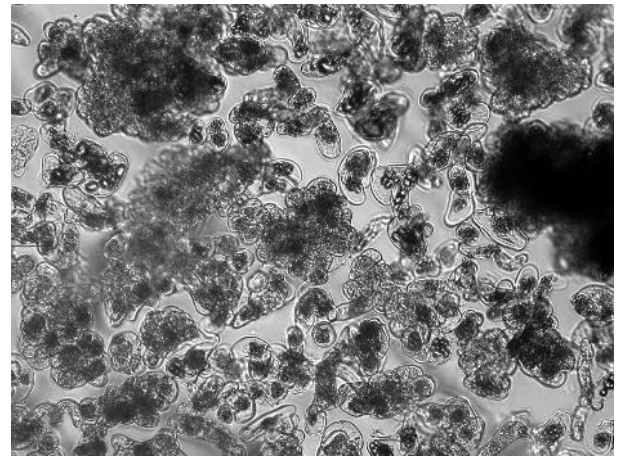
Durante el primer mes se observó fenolización en la zona de corte de los explantes y posteriormente el engrosamiento de los mismos. Transcurridos dos meses de cultivo se observaron estructuras globulares amarillas en la superficie de los explantes, las cuales se separaron de estos y comenzaron a liberar los agregados embriogénicos, además de la presencia de células alargadas y vacuoladas.

Se verificaron cambios en la composición de las SCE, en las que fue posible apreciar células embriogénicas pequeñas y esféricas, con un contenido citoplasmático denso, gránulos de almidón y una alta razón núcleo/citoplasma. A medida que se realizaron los subcultivos posteriores, la cantidad de células aisladas y parenquimatosas disminuyeron a valores casi nulos. Estos agregados embriogénicos llegaron a ocupar entre 90 y 94% de la suspensión celular y su tamaño varió entre 80 y 300  $\mu$ m transcurridos 135 días de cultivo (figura 1).

Los resultados alcanzados en este experimento permitieron el establecimiento de SCE a partir de los ápices de brotes axilares colocados directamente en el medio de cultivo líquido.

### **Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas**

Las curvas de crecimiento celular establecidas de las suspensiones celulares, se caracterizaron al inicio por una fase de reposo o latencia, debido a que en esta



**Figura 1.** Agregados celulares embriogénicos en suspensiones celulares obtenidas a partir de los ápices de brotes axilares del cv. 'FHIA - 25' (60x).

etapa las células se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo, para posteriormente iniciar e incrementar la velocidad de la división celular durante la fase exponencial.

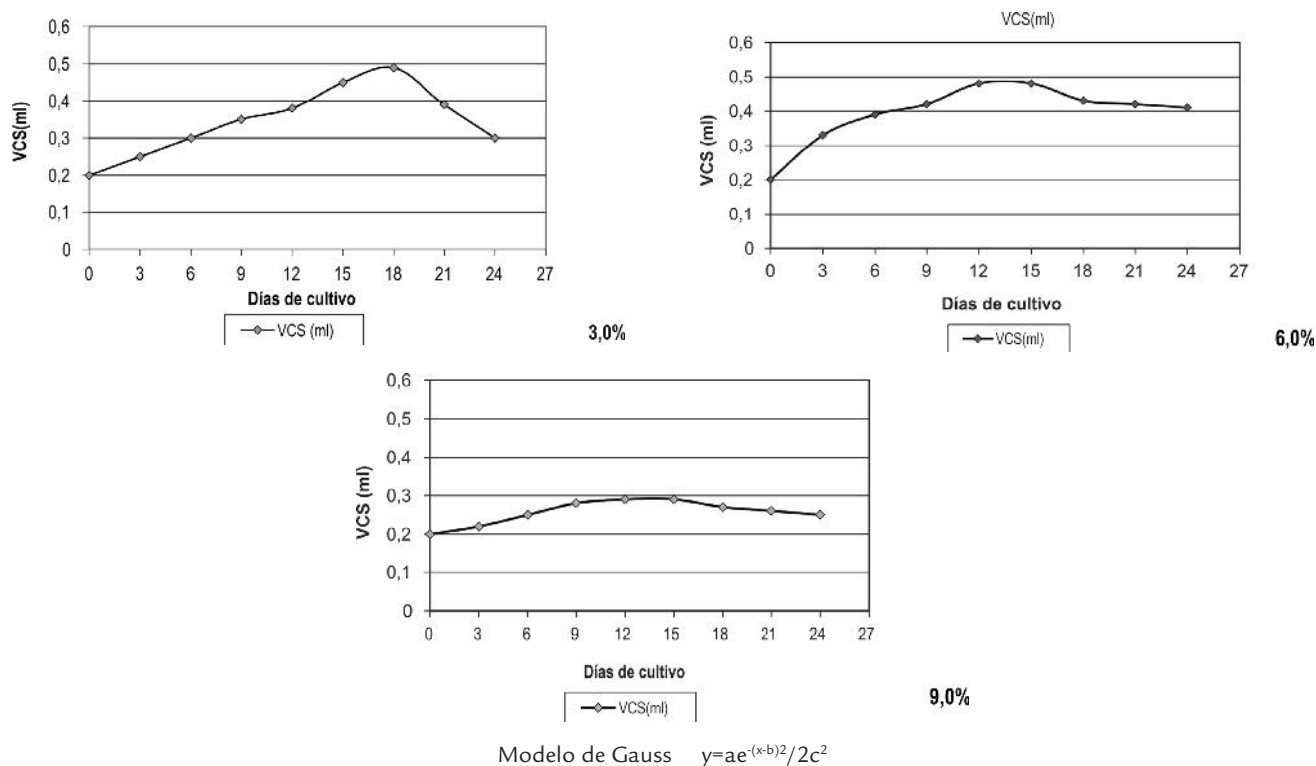
La densidad celular de 3,0% favoreció el incremento celular con relación a las curvas de crecimiento del 6,0 y 9,0 % (figura 2). En los datos obtenidos mediante el modelo de Gauss se observó que el mayor incremento de biomasa celular se produjo a los 23,1 días de cultivo (0,51 mL) al 3,0% de VCS.

Esta misma densidad celular (3%) mostró una fase de crecimiento exponencial, bien definida y continua, sin deterioro de la calidad celular (predominio de células meristemáticas y vitalidad celular de 90 - 95%).

Lo anterior demuestra que durante esta fase las células muestran intensa actividad metabólica y alcanzan su máxima tasa de división, lo cual indica que los subcultivos de las suspensiones celulares deben realizarse a la densidad celular del 3,0% de VCS y a los 15 días de cultivo, para que las mismas se mantengan en multiplicación continua sin pasar a la fase lineal.

En la densidad celular de 6,0% de VCS, según los datos obtenidos mediante el modelo de Gauss se observó que el mayor incremento de biomasa celular se produjo a los 15,2 días de cultivo (0,48 mL de VCS). A partir de esta fecha no se produjo incremento del volumen de células y comenzó a disminuir su calidad y vitalidad (figura 2).

Las células establecidas a una densidad del 9,0% durante 21 días de cultivo no llegaron a duplicar su volumen inicial y la calidad de la suspensión celular y su vitalidad disminuyeron bruscamente. Se comenzaron a observar células alargadas y con escasos gránulos de almidón.



VCS	a	b	c	R <sup>2</sup>
3,0%	0,509	23,107	16,695	0,997
6,0%	0,477	15, 239	12,991	0,954
9,0%	0,2978	14,2368	17,4112	0,8316

#### Leyenda:

- a. Máximo crecimiento de VCS;
- b. Número de días en que se alcanza el valor máximo de VCS;
- c. Varianza del modelo Gauss.

**Figura 2.** Influencia de la densidad celular en la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares establecidas en el cv. 'FHIA - 25'.

El momento adecuado para realizar el subcultivo de las suspensiones celulares, no puede coincidir con la máxima expresión de la densidad celular del cultivo en suspensión, ni con el momento en que se agotan las principales fuentes de energía, sino con la última fase de crecimiento exponencial.

Basado en los resultados alcanzados en este experimento, se pudo concluir que las suspensiones celulares iniciadas al 3,0% de densidad celular tuvieron una mejor respuesta bajo las condiciones de manejo y cultivo previamente explicadas.

#### Formación de los embriones somáticos

Transcurridos 45 días de haber sido plaqueadas las suspensiones celulares embriogénicas en el medio de cultivo RD1 se realizó el conteo de los embriones for-

mados. Las SCE 1 y 2 formaron un total de 1580 y 1610 embriones somáticos respectivamente por cada 200 µL plaqueados (tabla 3).

**Tabla 3.** Número de embriones somáticos formados a los 45 días de cultivo en el medio de cultivo RD1 semisólido del cv. 'FHIA - 25'.

Suspensiones	Embriones somáticos formados
Suspensión 1	1580 a
Suspensión 2	1610 a
Suspensión 3	803 b

ES± 0,22

Embriones somáticos formados con letras distintas difieren estadísticamente para  $p \leq 0,05$  según la prueba de Tukey.

Los resultados alcanzados durante esta etapa permitieron establecer como condición de cultivo para el cv. 'FHIA - 25', iniciar el proceso de histodiferenciación a partir de suspensiones celulares embriogénicas a la densidad celular de 12,0 %.

### Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación

Al evaluar el tiempo de incubación en el medio ME, se observó que cuando los embriones somáticos se incubaron durante 30 días se favoreció su maduración, con un 48,30% de embriones germinados, con diferencias significativas del resto de los tratamientos estudiados (tabla 4).

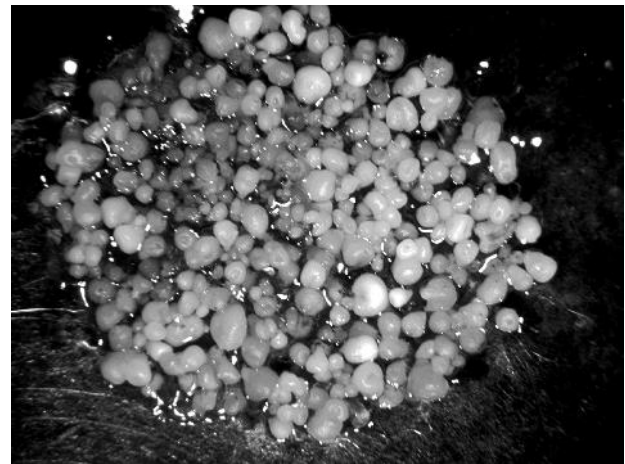
**Tabla 4.** Influencia del tiempo de cultivo (días), en el medio de maduración, sobre la germinación (%) de los embriones somáticos en el cv. 'FHIA - 25'.

Tiempo de cultivo	Embriones germinados (%)
15	30,50 c
30	48,30 a
45	36,80 b
Control (0)	15,00 d

ES  $\pm$  0,22

### Porcentajes con letras distintas difieren estadísticamente para $p \leq 0,01$ según la prueba de Tukey.

Los embriones somáticos maduros (figura 3) mostraron una invaginación de forma circular con el centro opaco y la presencia de una zona meristemática densa, correspondiente a un estado cordiforme, en su



**Figura 3.** Embriones somáticos maduros con invaginación circular (100x) a los 30 días de incubación en el medio de maduración.

desarrollo posterior el embrión evolucionó asimétricamente hasta convertirse en un embrión cotiledonar.

Cuando los embriones somáticos no fueron cultivados previamente en el medio ME, sólo germinó el 15 % de los mismos. A partir de estos resultados se definió para la fase de maduración una densidad de inóculo inicial de 0,5 gMF de embriones somáticos y 30 días de incubación.

### Conversión a plantas de los embriones somáticos

Al evaluar las características de las plantas provenientes de los embriones somáticos, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, se observó en ambos casos un alto porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización. En el caso de las plantas procedentes de embriones somáticos fue de 98 % y en el control de organogénesis de 97,4%.

Transcurridos 60 días en esta fase y previo a su trasplante a condiciones de campo, las plantas obtenidas

**Tabla 5.** Comparación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis a los 60 días en la fase de aclimatización del cv. 'FHIA - 25'.

Medio de cultivo	Largo del pecíolo (cm)	Ancho de la hoja 2 (cm)	Largo de la hoja 2 (cm)	Distancia entre las hojas 2 y 3 (cm)	Altura de la planta (cm)
Embriogénesis	4,95	9,60	26,00	1,80	40,00
Organogénesis	4,40	9,30	25,20	1,75	39,00
T-Student	0,021*	0,013*	0,022*	0,024*	0,7ns

Nivel de significación para  $p \leq 0,05$

en ambos sistemas de regeneración no mostraron anomalías fenotípicas. Con relación a las variables medidas excepto en la altura de la planta, hubo diferencias estadísticas significativas en las demás variables evaluadas a favor de las plantas regeneradas por embriogénesis somática (tabla 5).

Los resultados obtenidos en la investigación permitieron la elaboración de una metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática a partir de ápices de brotes axilares en el cultivar de plátano 'FHIA - 25' (figura 4).

## Discusión

### ***Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas a partir de ápices de brotes de yemas axilares***

El establecimiento de tres SCE de las cinco iniciadas a partir del explante de ápices de brotes axilares está en correspondencia con lo publicado por Schoofs *et al.* (1999), cuando señalaron que no todo complejo embriogénico dará una buena suspensión celular. Estos autores utilizaron las multiyemas como fuente de explante para el establecimiento de SCE y obtuvieron que la tasa exitosa fuera de uno de dos o uno de cinco, es decir, que la investigación desarrollada está en correspondencia con los resultados alcanzados por otros autores.

La formación de estructuras globulares amarillas y su posterior desarrollo también había sido señalada con anterioridad por otros autores como Dhed'a *et al.* (1991), quienes establecieron SCE a partir de "scalps", derivados de brotes adventicios (multiyemas), en el cultivar Bluggoe (ABB).

Las SCE establecidas se caracterizaron por la presencia de una alta proporción de agregados de células embriogénicas proliferantes, el cambio de color de amarillo brillante a pálido y la rápida sedimentación de células cuando la suspensión es retirada del vibrador orbital, lo cual indicó una alta densidad del contenido celular, como parámetros indicativos para identificar una SCE de buena calidad (Strosse *et al.*, 2003)

Chong *et al.*, (2005) establecieron suspensiones celulares directamente de los explantes de inflorescencias masculinas inmaduras, lo cual permitió obtener SCE homogéneas en 20 semanas con una respuesta superior al 70% de los explantes inoculados.

### ***Efecto de la densidad celular en la multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas***

Schoofs *et al.*, (1999) establecieron en la etapa de multiplicación celular curvas de crecimiento logarítmico en SCE, derivadas del explante de multiyemas en el cv. 'Williams' (AAA). Estos autores obtuvieron que las

densidades celulares de 3,0 y 5,0 % fueron superiores al 10% y a su vez estas suspensiones celulares revelaron bajo estas condiciones, una fase logarítmica casi ausente.

También Barranco (2001) a partir de suspensiones establecidas de embriones somáticos obtenidos del cultivo de flores masculinas en el cv. 'FHIA - 18' (AAAB), alcanzó la mejor multiplicación a la densidad celular de 3,0% de VCS con una curva de crecimiento exponencial.

Resultados similares fueron obtenidos por López (2006), con relación a la mejor respuesta de la densidad celular del 3% de VCS al estudiar la curva de crecimiento en suspensiones celulares del cv. 'Navolean' (grupo AAB), con un incremento de biomasa celular (0,474 mL) a los 23 días de cultivo.

Cuando se estudiaron las curvas de crecimiento al 6% y 9% de VCS se observó que independientemente de que disminuye en el tiempo la cantidad de biomasa celular, también disminuye la calidad de la suspensión celular, al ser necesario incrementar el número de subcultivos a realizar, corroborado por Georget *et al.* (2000), al referir que la SCE pierde calidad con el número de subcultivos, e incrementa la probabilidad de contaminación, disminuyendo la tasa de crecimiento y capacidad de regeneración, debido entre otros factores a la disminución de nutrientes y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente el 2,4-D, así como a la proliferación de las células densas de rápido crecimiento ricas en almidón.

### ***Formación de los embriones somáticos***

Dhed'a *et al.*, (1991) en el cv. 'Bluggoe' (ABB) obtuvieron formación de embriones somáticos en el medio de cultivo RD1 líquido, a partir de suspensiones celulares. Schoofs (1997), obtuvo de  $10^2$  a  $10^4$  embriones somáticos por mL de VCS en medio de cultivo RD1 semi-sólido, a partir de suspensiones celulares de plátanos.

Arnold *et al.*, (2002), al respecto señalaron además, que es importante tener en cuenta que para facilitar la formación y la sincronización de los embriones somáticos es necesario tamizar los agregados celulares y lavar éstos antes de su inoculación, para eliminar residuos del medio de cultivo anterior.

Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación fueron reportados por Barranco (2000) en el cultivar Gran Enano (AAA), con el ajuste al 15% de densidad celular de las SCE, logró el proceso de histodiferenciación en medio de cultivo líquido y formó  $2561,5 \pm 95,3$  embriones somáticos.

Chong *et al.* (2005) al estudiar varias densidades celulares, obtuvieron diferentes cantidades de embriones somáticos, lo cual pudo estar influenciado por los diferentes potenciales embriogénicos de las líneas celu-



lares de Gran Enano (AAA), todo lo cual corrobora los resultados obtenidos en la investigación realizada.

### ***Influencia del tiempo de cultivo para la maduración de los embriones somáticos y su germinación***

Emb cotiled característico de especies monocotiledóneas según fue señalado por Natesh y Rau (1984).

Los embriones somáticos en etapa globular no están preparados para germinar y por tanto necesitan ser colocados en un medio específico para favorecer su maduración (Suárez-Castellá *et al.*, 2012), siendo necesario la etapa de maduración del embrión donde ocurre la expansión de la célula y la acumulación de sustancias de reserva (Corredoira *et al.*, 2003).

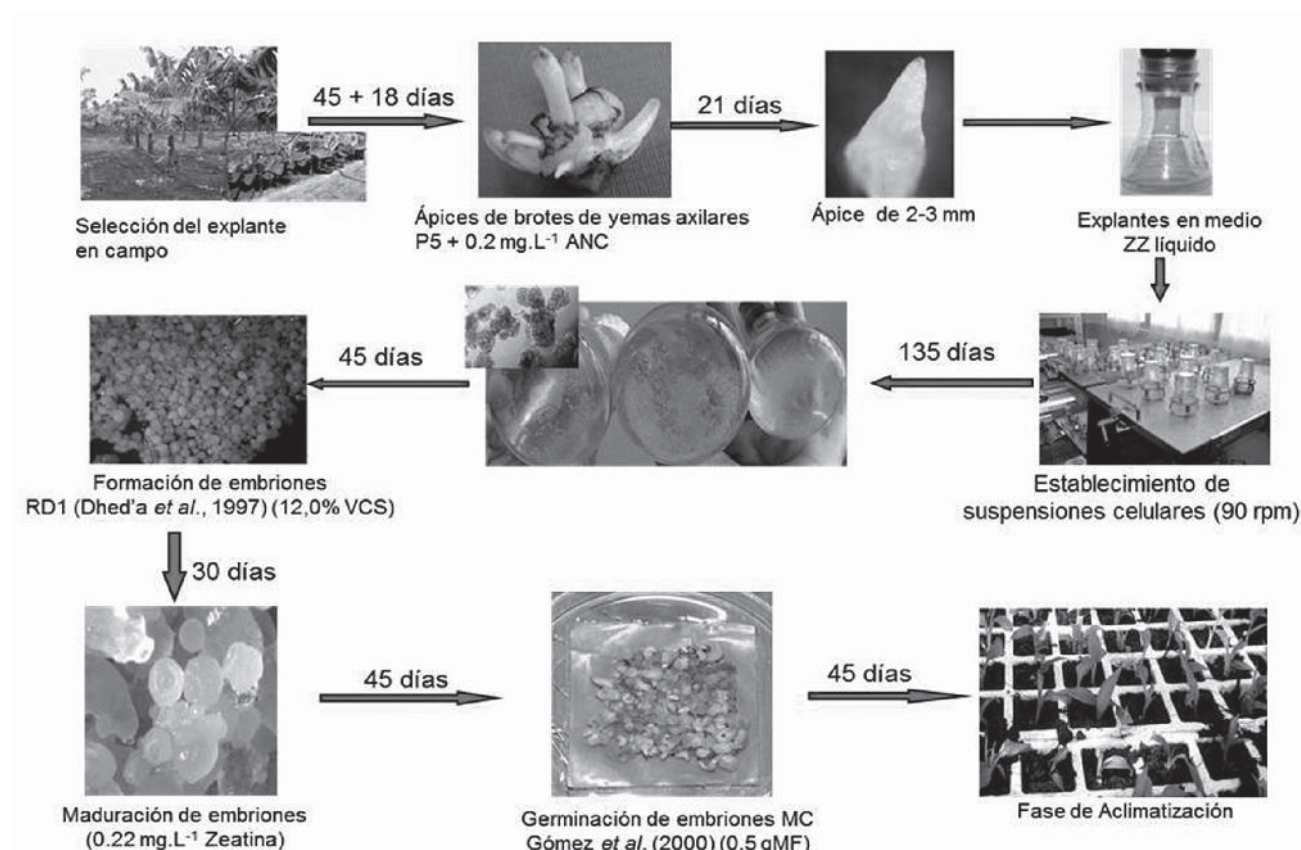
Daniels *et al.*, (2002) en el cv. 'FHIA - 21' (Musa AAAB) observaron que la densidad celular y el tiempo de permanencia en el medio de cultivo de maduración influyen en el número de embriones somáticos germinados, lo cual pudo ser corroborado en la presente investigación.

Barranco (2001) en el cv. 'FHIA - 18' (AAAB) al establecer embriones somáticos a densidades de entre 0,4 y 0,8 gMF en Erlenmeyer de 250 ml que contenía 25

mL de medio de cultivo, incubados en condiciones de oscuridad y temperatura de  $27 \pm 0.2^\circ\text{C}$  en un agitador orbital. Estos tuvieron una rápida maduración, la cual ocurrió entre 15 y 22 días de cultivo. López (2006) al estudiar la interacción de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos y el tiempo de incubación en el medio de maduración, en el cv. 'Navolean', observó que la mejor combinación fue la densidad de 0,5 gMF de embriones durante 30 días de cultivo, logrando un porcentaje de germinación de 46,8%. Además este mismo autor demostró que cuando los embriones somáticos no fueron cultivados previamente en el medio de cultivo de maduración, sólo germinó el 18,6% de los mismos.

Barranco (2001) logró 40,6% de germinación en el cultivar híbrido 'FHIA - 18' en medio de cultivo semi-sólido; y Cabrera *et al.*, (2002) en el cv. 'Navolean' (ABB) un 49,3% de germinación en el medio propuesto por Gómez *et al.*, 2000.

Los resultados obtenidos por dichos autores corroboran los alcanzados en la presente investigación, evidenciando la importancia de la etapa de maduración de los embriones somáticos para incrementar su porcentaje de germinación.



**Figura 4.** Esquema de trabajo para el desarrollo de la embriogénesis somática del cultivar 'FHIA - 25' (Musa AAB)

## Conversión a plantas de los embriones somáticos

La eficiencia del proceso embriogénico de cualquier especie vegetal, está dada por la germinación y conversión de los embriones somáticos en plantas, etapas que constituyen requisitos indispensables (López, 2006).

De una total de 350 plantas evaluadas procedentes de los embriones somáticos, se logró una supervivencia del 98%, en comparación con las plantas regeneradas por organogénesis, que alcanzaron 97,4%. Resultados similares fueron obtenidos por López (2006) al estudiar la conversión a plantas de embriones somáticos del cultivar Navolean sin la presencia de variación somaclonal en la fase de aclimatización, lo cual corroboró lo planteado por Sandoval *et al.*, (1997) al afirmar que en esta fase solamente se puede detectar alrededor de un 60% de variantes somaclonales, cual no implica que no se hayan producido, sino que no fue posible su observación visual, por tanto se hace necesario continuar las evaluaciones de estas plantas en campo hasta completar su ciclo de desarrollo. Sin embargo, López (2006) al evaluar la conversión a plantas de los embriones somáticos del cultivar Navolen, observó que un 0,5% mostraban variación somaclonal con características de hojas variegadas, descrita por Reuveni e Israeli (1990) como “axilares mosaic-like”.

Côte *et al.*, (2000), durante la fase de aclimatización de plantas regeneradas de embriones somáticos en el cv. ‘Gran Enano’ (AAA) observaron que en el 0,5 -1,3% de la población tuvieron hojas variegadas, y señalaron además que cuando estas plantas fueron llevadas a campo desapareció esta anomalía morfológica, quizás debido a cambios epigenéticos ocurridos.

## Conclusiones

Se logró la regeneración de plantas del cv. ‘FHIA – 25’ vía embriogénesis somática, a partir de los embriones somáticos formados al 12% de densidad celular y posteriormente madurados durante 30 días.

La metodología desarrollada propició la conversión de los embriones somáticos a plantas con una supervivencia del 98% de éstas en la fase de aclimatización.

## Referencias

Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. y Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233–249.

Barranco, L.A. (2000). *Desarrollo de la embriogénesis somática en medios líquidos (Musa AAA cv. ‘Gran Enano’)*. (Doctoral dissertation, Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba). p. 57.

Barranco, L.A. (2001). Embriogénesis somática en banano (*Musa AAAB*, cv. ‘FHIA-18’) empleando medios de cultivo líquidos. Santa Clara, Cuba, Instituto de Biotecnología de las Plantas, p.107.

Cabrera, M., López, J., Gómez, R., Montano, N., Reyes, M., Reynaldo, D., Ventura, J., Santos, A., García, M., Basail, M. y Espinosa, E. (2002). Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de Suspensiones Celulares Embriogénicas en plátano ‘Navolean’ (AAB). *Biotechnología Vegetal*, 2, 115-117.

Corredoira, E., Ballester, A., y Vieitez, A.M. (2003). Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Annals of Botany*, 92(1), 129-136.

Côte, F., Folliot, M., Domergue, R. y Dubois, C. (2000). Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (*Musa* AAA, cv. Grand Naine). *Euphytica*, 112, 245-251.

Chong, B., Gómez, R., Reyes, M., Bermúdez Carballoso, I., Gallardo, J., Freire, M., Posada, L., Herrera, I. y Swennen, R. (2005). Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de ‘Grande naine’ (AAA). *InfoMusa*, 14(1),13-17.

Daniels, D., Kosky, R.G. y Vega, M.R. (2002). Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB group). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(4), 330-333.

Dhed’a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. y De Langhe, E. (1991). Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. “Bluggoe” (*Musa* spp. ABB group). *Fruits*, 46, 125-135.

Escalant, J.V; y Jain, S.M. (2004). Banana improvement with cellular and molecular biology, and induced mutations: Future and perspectives. En: *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. S.M. Jain y R. Swennen (eds), USA: Science Publishers, Inc., Enfield, NH, pp. 359-367.

FAO. (2015). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Dirección de Estadística. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Citado el 22 de julio de 2015.

Georget, F., Côte, F., Domergue, R. y Ferrière, N. (2000). Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. ‘Grande naine’) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports*, 19(8), 748-754.

Gómez, R., Gilliard, T., Barranco, L.A. y Reyes, M. (2000). Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido ‘FHIA18’ (AAAB). *Infomusa*, 9(1), 12-16.

Ibaraki y Kurata, K. (2001). Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 179–199.

Kamle, M., Bajpai, A., Chandra, R., Kalim, S. y Kumar, R. (2011). Somatic embryogenesis for crop improvement. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 54-59.

López, J. (1999). Genetic improvement of *Musa* spp. by *in vitro* mutational plant breeding. *Infomusa*. 8: 2 - PROMUSA XV.

López, J. (2006). Nueva metodología para el desarrollo de la embriogénesis somática en el cultivar de plátano vianda ‘Navolean’ (*Musa* spp., grupo AAB). Ciego de Ávila, Cuba: Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, p. 100

Merkle, S., Parrott, W. y Flinn, B. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: T.A. Thorpe (ed.), *In vitro Embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. pp. 155-203.

Natesh, S., Rau, M.A. (1984). *The embryo*. En: *Embryology of Angiosperms*. B.M. Johri (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 377-344.

- Perea, M. (2001). La biotecnología como soporte en el mejoramiento de las Musáceas. En: Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. *Biotecnología Agrícola*, M. Perea (ed.), Bogotá, Colombia, pp. 139-149.
- Pérez, J.N., Agramante, D., Jiménez, F. y Ramírez, D. (1999). Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV, enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar. Santa Clara, Cuba: IBP, p. 82.
- Reuveni, O. e Israeli, Y. (1990). Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. *Acta Horticulturae*, 257, 307-313.
- Rodríguez, S. (2000). Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Villa Clara, Cuba: INIVIT, p. 96
- Sánchez, R., Pino, J.A., Vallin, C., Pérez, M.E., Iznaga, Y. y Malpartida, F. (2002). Effects of the natural fungicide F20 on black Sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain (AAB) and banana (AAA). *Infomusa*, 11(1), 14-16.
- Sandoval, J.A., Pérez, L. y Côte, F. (1997). Estudio morfológico y de la estabilidad genética de plantas variantes de banano (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). *CORBANA*, 22(48), 41-60.
- Schoofs, H. (1997). The origin of embryogenic cells in *Musa*. Leuven, Belgium: UKL. p. 257.
- Schoofs, H., Panis, B., Strosse, H., Mayo, A., López, J., Roux, N., Dolezel, J. y Swennen, R. (1999). Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *Infomusa*, 9(2), 3-6.
- Steward, F.C., Mapes, M.O. y Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*, 45, 693-704.
- Stover, R. y Simmonds, N. (1987). Bananas. Harlow 3rd ed. Longman Scientific & Technical. Essex, England
- Strosse, H., Domergue, R., Panis, B., Escalanty, J.V., Côte, F. (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. *Technical Guidelines 8*. INIBAP, Montpellier, France. p 36.
- Suárez-Castellá, M., Kosky, R. G., Chong-Pérez, B., Reyes, M., García-Águila, L., Sarria, Z., Orellana, P., Rodríguez, A., Triana, R., Pérez, Z., González, M., León, M., Perez, B. (2012). Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa* spp. y su impacto económico. *Biotecnología Vegetal*, 12(1), 41 – 48.
- Widholm, J. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology*, 47, 189-194.

# Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*

## Standardization of the disinfection protocol for the micropropagation of *Aspidosperma polyneuron*

García Lozano Diana Lorena \*, Mesa López Neftalí\*\*, Ocampo Guerrero Martha Lily\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277

### Resumen

*Aspidosperma polyneuron* es un especie nativa de la región neotropical, en países como Colombia, Venezuela, Perú, Brasil, Argentina y Paraguay, propio de bosques semidecíduos, catalogada desde 1998 por la UICN como "En Peligro (EN)", debido a que sus poblaciones naturales fueron sometidas a una intensa explotación con fines madereros y su hábitat se vio seriamente degradado por actividades agrícolas y silvopastoriles. Las dificultades para su regeneración natural y el enraizamiento de las estacas, hace que el cultivo *in vitro* sea una eficaz herramienta para contrarrestar las dificultades reproductivas que presenta. Sin embargo, la presencia de contaminantes que afectan la viabilidad de los explantes, precisa el desarrollo de protocolos que permitan el establecimiento *in vitro* de la especie. El objetivo de la presente investigación fue lograr el establecimiento aséptico y la inducción de la calogénesis en explantes de *A. polyneuron*, mediante la evaluación de diferentes tratamientos de desinfección. Los explantes se obtuvieron de individuos de regeneración natural, en el municipio de Armero, departamento del Tolima, los cuales se sumergieron en agua destilada con una gota de Tween® 80 por cada 100 ml, durante 10 minutos y lavados con agua destilada estéril. Se utilizaron como agentes desinfectantes, el hipoclorito de sodio y el dicloruro de mercurio a distintas concentraciones y tiempos de inmersión. De los explantes utilizados: ápices, segmentos nodales y láminas foliares, este último fue seleccionado por su capacidad de producir callos friables de color verde, para lo cual una desinfección con dicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.125% durante 10 minutos fue suficiente para el control de la contaminación y bajos índices de oxidación.

**Palabras clave:** *in vitro*, dicloruro de mercurio, contaminación endógena y exógena. especie forestal.

### Abstract

*Aspidosperma polyneuron* is a species native to the Neotropics, in countries like Colombia, Venezuela, Peru, Brazil, Argentina and Paraguay, typical of semi-deciduous forests, catalogued since 1998 by the IUCN as "Endangered (EN)", because its natural populations were subjected to an intense exploitation for timber and its habitat was seriously degraded by agricultural and silvopastoral activities. The difficulties for its natural regeneration and the rooting of cuttings, make the *in vitro* culture an efficient tool to counteract the reproductive difficulties that it presents. However, the presence of pollutants that affect the viability of the explants needs the development of protocols that allow the *in vitro* establishment of this species. The objective of this research was to achieve aseptic establishment and the induction of callogenesis in explants of *A. polyneuron*, by evaluating different disinfection treatments. The explants were obtained from individuals of natural regeneration, in the Municipality of Armero in the Department of Tolima, which were immersed in distilled water with a drop of Tween® 80 for each 100 ml, for 10 minutes and then rinsed with sterile distilled water. There were used as disinfectant agents, sodium hypochlorite and mercury dichloride in different concentrations and times of immersion. Among the used explants: buds, nodal segments and leaf blades, the last one was selected for its capacity of producing friable and green callosity, for which a disinfection with mercury dichloride (HgCl<sub>2</sub>) 0.125% for 10 minutes was enough for contamination control and low indexes of oxidation.

**Key words:** *in vitro*, mercury dichloride, endogen and exogen contamination, forestal species.

**Recibido:** enero 16 de 2015

**Aprobado:** septiembre 25 de 2015

\* Bióloga, Universidad del Tolima, AA 546. dianagarcia88@gmail.com

\*\* Docente de Planta Facultad de Ciencias. Director Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología Vegetal y Microbiana. GEBIUT. Universidad del Tolima. AA 546 nmesa@ut.edu.co

\*\*\* Docente de Planta Facultad de Ciencias. Investigadora Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología Vegetal y Microbiana. GEBIUT. Universidad del Tolima. AA 546 mlocampo@ut.edu.co



## Introducción

*Aspidosperma polyneuron* es una especie que presenta serios problemas de regeneración natural; por ser un árbol de crecimiento lento, tarda casi 50 años en llegar a su etapa fértil, con alternancia en la floración por periodos de hasta cuatro años y aunque produce abundantes semillas, las tasas de germinación son muy heterogéneas (35-70%), además, son de difícil recolección debido a la altura de los árboles que pueden alcanzar hasta 40 m en condiciones naturales. Sumado a esto el difícil enraizamiento de las estacas hace que la propagación vegetativa de esta especie no tenga el éxito esperado (Damasceno *et al.*, 2011; Del Valle, 1972; Ezcurra, *et al.*, 1992; Mozo, 1972; PROEXPO, 1970; Ribas *et al.*, 2005; Sakita *et al.*, 2007; Valeiro *et al.*, 2008).

Esta especie se encuentra en el Libro rojo de plantas de Colombia bajo la categoría global y nacional "En Peligro (EN)", debido a que su hábitat se ha visto severamente degradado, además la intensa explotación a la que fué sometido dio como resultado que las poblaciones naturales se vieran drásticamente reducidas. En Colombia entidades como la Corporación para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMG), prohíbe el aprovechamiento de *A. polyneuron* y ha vedado su comercialización bajo cualquier modalidad. Otra entidad que vela por la conservación de esta especie es el Sistema de Parques Nacionales Naturales, ya que protege las poblaciones naturales de cualquier explotación (Salinas & Cárdenas López, 2007).

La biotecnología es una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales si se tiene en cuenta que la producción de material seleccionado requiere un alto conocimiento de la biología reproductiva, así como de los mecanismos fisiológicos que influyen en la capacidad morfogénica, según Hodson de Jaramillo (2004). Siendo entonces, el cultivo de tejidos vegetales una herramienta biotecnológica que puede ser una solución a problemas naturales e inducidos que presentan algunas especies.

Una de las dificultades para el establecimiento de cultivos *in vitro*, es la presencia de microorganismos contaminantes tanto endógenos como exógenos que afectan la viabilidad y el desarrollo de los explantes una vez que se han establecido *in vitro*, por lo tanto se requiere establecer protocolos que conlleven a minimizar o eliminar dichos microorganismos sin afectar la viabilidad de los explantes.

El objetivo de la presente investigación fue lograr el establecimiento aséptico y la inducción de la callogénesis en explantes de *A. polyneuron*, mediante la evaluación de diferentes tratamientos de desinfección.

## Materiales y métodos

**Colecta de material vegetal:** se establecieron dos áreas de muestreo, la primera en el Centro Universi-

tario Regional del Norte de la Universidad del Tolima (CURNUT), en el municipio de Armero-Guayabal en un bosque de regeneración natural de *A. polyneuron*, a una altitud de 320 m s.n.m. y una temperatura ambiente de 29,5°C; la segunda en el municipio de Coello en el corregimiento de Chucualí, lote sembrado con individuos de la especie, ubicada a 270 m s.n.m. y una temperatura ambiente de 29°C. Se seleccionaron tejidos de ramas juveniles y sin daño mecánico, en las dos áreas se realizó colecta de yemas apicales y para el área de CURNUT, se extrajeron algunas plántulas juveniles para adaptarlas a condiciones de invernadero y establecerlas como plantas madre.

**Fase de laboratorio:** la presente investigación se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Protección de Plantas y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad del Tolima. Las plántulas juveniles una vez ubicadas en el invernadero, fueron sometidas a tratamientos con Benomil 5g/l, ocho días antes de la toma de los explantes y para los casos en los que se presentó ataque de insectos se realizó tratamientos con insecticida. Se realizó procesos de juvenilización mediante constantes podas para inducir rebrotes, de los cuales se tomaron los explantes (ápices, segmentos nodales y láminas foliares).

**Preparación de los medios de cultivo:** para todos los tratamientos de desinfección empleados se uso medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 30 g/l de sacarosa como fuente de carbono, se ajustó el pH a 5,7 antes de la adición de agar 7g/l; se sirvieron 20 ml de la solución en recipientes de vidrio, debidamente rotulados según los tratamientos, para luego ser esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

Para inducir la formación de callos se tomaron explantes de hojas jóvenes, las cuales fueron cultivadas en medios MS (Murashige & Skoog, 1962) y WPM (Lloyd & McCown, 1980), adicionados con 30 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar y un pH ajustado a 5,7. Se realizaron los siguientes tratamientos de reguladores de crecimiento vegetal: con 2,4 -D (1 y 2 mg/l) y sus respectivas combinaciones con BAP (1 mg/l).

Las láminas foliares fueron divididas en tercios (ápice, medio y base) de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> y cada uno sembrados en frascos diferentes, las siembras se hicieron colocando las hojas por la haz o por el envés, para un total de 16 tratamientos con 10 réplicas. Las observaciones se realizaron por 45 días, tiempo durante el cual se realizaron dos subcultivos, el primero a los 20 días y el segundo a los 40 días.

Todos los tratamientos resultantes fueron incubados bajo condiciones de fotoperiodo de 12 horas luz, temperatura de 23-25°C. Durante el periodo de observación se midieron variables como la coloración (verde claro o marrón), consistencia del callo (friable o compacto) y la formación parcial o completa de los callos.

**Desinfección del material vegetal:** una vez seleccionados los explantes, se lavaron con agua de la llave para retirar cualquier partícula que pudiera estar presente; luego el material se sumergió en 100 ml de agua destilada con una gota de Tween®80, en agitación constante durante 10 minutos. Se continuó con tres lavados con agua destilada para retirar el detergente; posteriormente se sumergieron, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición según el explante, en la solución desinfectante. Finalmente se hicieron tres lavados con agua destilada esterilizada con el fin de eliminar cualquier traza de desinfectante. Para ápices se realizó un total de 21 tratamientos, para segmentos nodales 19 y para hojas se evaluó un total de 13 tratamientos de desinfección. Para cada uno de los tratamientos de desinfección empleados se realizaron 10 réplicas.

**1. Tratamientos de desinfección para ápices.** La investigación se realizó en yemas apicales escogidas por su mayor tamaño en relación con las laterales y por ende mayor facilidad para la extracción de meristemos, sin embargo se observó que cuando estos quedaban totalmente descubiertos se oxidaban completamente, por lo tanto se trabajó con ápices a los que sólo se les retiró los primordios foliares más externos. Se realizaron tratamientos de desinfección con NaClO y otro de doble desinfección con HgCl<sub>2</sub>.

**2. Tabla 1.** Tratamientos de desinfección empleados en ápices de *A. polyneuron*.

Código	Tratamiento
TDA1	NaClO 0,25% por 10'
TDA2	NaClO 0,25% por 20'
TDA3	NaClO 0,25% por 30'
TDA4	NaClO 0,5% por 10'
TDA5	NaClO 0,5% por 20'
TDA6	NaClO 0,5% por 30'
TDA7	NaClO 1,5% por 10'
TDA8	NaClO 1,5% por 20'
TDA9	NaClO 1,5% por 30'
TDA10	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 5'
TDA11	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 10'
TDA12	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 15'
TDA13	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 20'
TDA14	HgCl <sub>2</sub> 0,3% por 10'
TDA15	HgCl <sub>2</sub> 0,3% por 20'
TDA16	HgCl <sub>2</sub> 0,4% por 5'
TDA17	HgCl <sub>2</sub> 0,4% por 10'

Código	Tratamiento
TDA18	HgCl <sub>2</sub> 0,4% por 15'
TDA19	HgCl <sub>2</sub> 0,5% por 15', HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 10'
TDA20	HgCl <sub>2</sub> 0,5% por 15', HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 10' ( CA*).
TDA21	HgCl <sub>2</sub> 0,3% por 10', HgCl <sub>2</sub> 0,1% por 1'

\* CA: Carbón activado

Fuente: Autores

**3. Tratamientos de desinfección para segmentos nodales.** Se tomaron segmentos de un centímetro de longitud por 3-4 milímetros de diámetro con un nudo completo. Se usaron soluciones desinfectantes de NaClO y HgCl<sub>2</sub> en varias concentraciones y tiempos de exposición. Una vez finalizada la desinfección, se hicieron cortes transversales en la base del explante con el fin de eliminar los extremos que se observan afectados por el desinfectante, además se procuró dejar una yema por nudo con el fin de que el explante presente el tejido meristemático apto para su brotación. En este tipo de explante también se realizaron tratamientos de doble desinfección con HgCl<sub>2</sub>. Se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento. Los tratamientos propuestos se observan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Tratamientos de desinfección empleados en segmentos nodales de *A. polyneuron*.

Código	Tratamiento
TDS1	NaClO 0,25% por 10'
TDS2	NaClO 0,25% por 20'
TDS3	NaClO 0,25% por 30'
TDS4	NaClO 1,5% por 10'
TDS5	NaClO 1,5% por 20'
TDS6	NaClO 1,5% por 30'
TDS7	NaClO 2,5% por 10'
TDS8	NaClO 2,5% por 20'
TDS9	NaClO 2,5% por 30'
TDS10	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 5'
TDS11	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 10'
TDS12	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 5' con CA*.
TDS13	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 10'
TDS14	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 10' con CA.
TDS15	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 20'

Código	Tratamiento
TDS16	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 20' con CA.
TDS17	HgCl <sub>2</sub> 0,25 por 5'
TDS18	HgCl <sub>2</sub> 0,25% por 15', HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 10' sin CA
TDS19	HgCl <sub>2</sub> 0,25% por 15', HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 10' con CA

\* CA: Carbón activado

Fuente: Autores

4. **Tratamientos de desinfección para láminas foliares.** Se seleccionaron las hojas más cercanas al ápice para someterlas a los tratamientos de desinfección, en los cuales también se emplearon soluciones de NaClO y HgCl<sub>2</sub>. Una vez desinfectadas y en condiciones de asepsia se realizaron cortes por todo el margen de la hoja, con el fin de eliminar el tejido que pudo haberse necrosado después de la desinfección. Los tratamientos se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3.** Tratamientos de desinfección empleados en explantes foliares de *A. polyneuron*.

Código	Tratamiento
TDH1	NaClO 1% por 10'
TDH2	NaClO 2% por 10'
TDH3	NaClO 3% por 10'
TDH4	NaClO 5% por 10'
TDH5	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 5'
TDH6	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 10'
TDH7	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 10' Con CA*.
TDH8	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 15'
TDH9	HgCl <sub>2</sub> 0,125% por 15' con CA.
TDH10	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 10'
TDH11	HgCl <sub>2</sub> 0,2% por 20'
TDH12	HgCl <sub>2</sub> 0,25% por 5'
TDH13	HgCl <sub>2</sub> 0,25% por 10'

\* CA: Carbón activado

Fuente: Autores

Una vez inoculadas en el medio de cultivo MS, fueron incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas luz (lámparas fluorescentes de 1000 lux) a una temperatura de 23-25 °C, durante tres semanas, al cabo de las cuales se determinó el número de explantes contaminados por hongos y/o bacterias mediante observaciones diarias, los primeros días después de la siembra, luego

semanalmente. También se estableció el número de explantes oxidados, mediante observaciones semanales, finalmente se determinó el número de explantes sanos y viables.

**Fase estadística:** la evaluación de resultados para esta etapa se realizó mediante el análisis factorial de correspondencia múltiple, mediante la herramienta de mapas perceptuales. La información fue procesada con el software estadístico multivariado SPAD 4.5. El análisis de correspondencias es un método estadístico exploratorio que se aplica con base en el análisis de tablas de contingencia que reflejan unos mapas perceptuales conformados por dos factores principales: F1 sobre el eje de las X, que es el que absorbe mayor información en variabilidad con respecto a los tratamientos originales, que estén más próximas al punto de inercia u origen (promedio) y F2, sobre el eje de las Y, que es el segundo factor en la escala de captación de información sobre el resto de los tratamientos originales. En dicho gráfico se representan conjuntamente las distintas modalidades de la tabla de contingencia (se contaminó 1, no se contaminó 2 y se oxidó 3), de forma que la proximidad entre los puntos representados por estas modalidades, reflejan un nivel de asociación entre ellas y además las que estén más próximas al punto de origen son las que más se caracterizan con base en el contexto.

## Resultados y discusión

En la evaluación de la contaminación, se observó que en los tres explantes propuestos, los porcentajes más altos de contaminación se alcanzaron cuando el agente desinfectante fue el NaClO; pérdidas, en la mayoría de los casos, de hasta el 100% de las muestras, principalmente por la aparición de hongos. Cuando se trabaja con material de campo, este es uno de los principales factores que afecta el establecimiento de los explantes (Abdelnour *et al.*, 2011).

Como se puede observar, en la figura 1 el mapa perceptual para la desinfección de ápices de *A. polyneuron*, los tratamientos más cercanos al punto de inercia son aquellos en los que se usó el NaClO, pero estos no controlaron (100% de contaminación), por lo que se denominó como “contaminado”; se confirma así, que este desinfectante fue ineficiente para el control de la contaminación; más distantes se encuentran los tratamientos con HgCl<sub>2</sub>, aunque estos tampoco controlaron la contaminación. Ante estos ensayos poco exitosos, se emplearon tratamientos de doble desinfección con HgCl<sub>2</sub>, los cuales se observan muy cerca del origen; sin embargo, los tratamientos TDA19 y TDA20, presentaron una oxidación cercana al 80% de los explantes; tan solo el tratamiento HgCl<sub>2</sub> 0,3% por 10' y HgCl<sub>2</sub> 0,1% por 1' (TDA21), mostró ser efectivo, pues su respuesta “no contaminado” se encuentra cerca del punto de inercia, con un control de la contaminación del 80 al 100%, igualmente este tratamiento no

presentó problemas de oxidación, lo que se traduce en el mejor tratamiento de desinfección empleado en ápices de *A. polyneuron*.

El  $\text{HgCl}_2$  viene siendo utilizado con éxito en forma de solución desinfectante, en muchas especies forestales y leñosas, con serios problemas de contaminación, como lo mencionan Zibbu & Batra (2010).

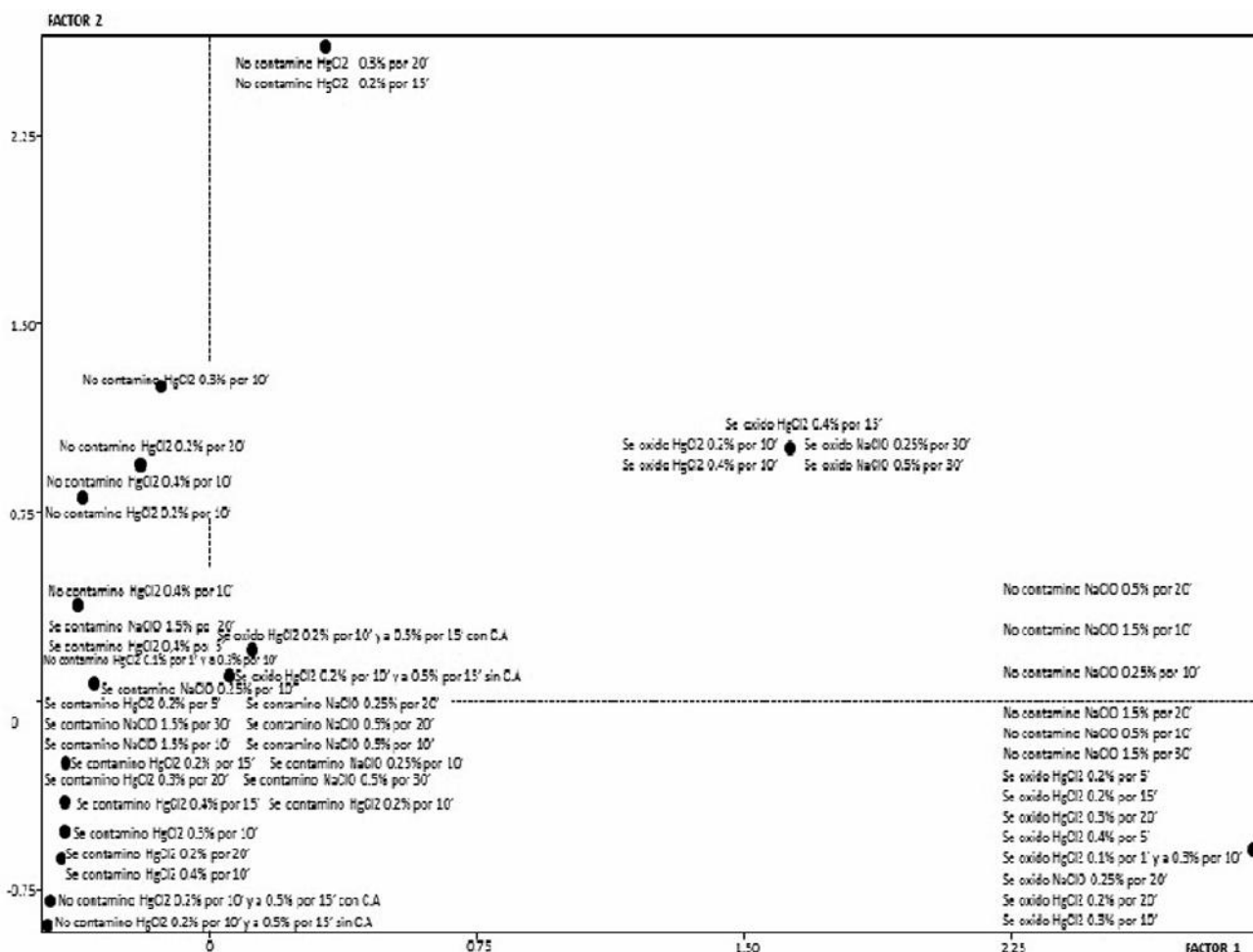
La edad fisiológica del tejido que se utiliza para iniciar el establecimiento de los cultivos, también tiene gran influencia en el proceso de desinfección, ya que el material tomado de plantas en crecimiento es más fácil de desinfectar en comparación con el obtenido de plantas maduras, en donde los depósitos de ceras y ligninas son mayores, y a su vez se convierten en una barrera para la acción del agente desinfectante sobre los microorganismos endógenos (López *et al.*, 2010; Pedroza *et al.*, 2007; Toro, 2004).

Según Abdelwahd *et al.* (2008) y Pedroza *et al.* (2007), la obtención de explantes para iniciar actividades de

cultivo *in vitro*, necesariamente implica causar cortes o heridas en los tejidos, los cuales facilitan la entrada de nutrientes y fitohormonas, pero favorecen también la exudación de compuestos relacionados con la cicatrización y defensa contra agentes externos (principalmente patógenos), estos compuestos generalmente de estructura fenólica, son rápidamente oxidados, causando el oscurecimiento del medio de cultivo y de los tejidos, haciendo que estos se necrosen y mueran.

En el gráfico también se puede percibir, como en todos los tratamientos de desinfección empleados, que la oxidación fue baja (menor al 20%) y los puntos graficados para esta modalidad se encuentran alejados del origen, a excepción de los tratamientos TDA19 y TDA20, en la que este fenómeno predominó.

La figura 2, muestra el mapa perceptual para los tratamientos de desinfección empleados en segmentos nodales. Cerca del origen se ubican aquellos tratamientos que presentaron contaminación y oxidación (valores superiores al 70%). Los tratamientos con Na-



**Figura 1.** Mapa perceptual que refleja la asociación de los 21 tratamientos de desinfección empleados en ápices de *A. polyneuron*.  
Fuente: Autores



CIO presentan más contaminación en relación con los que se utilizó el  $\text{HgCl}_2$ , pero en éste, la oxidación es más frecuente. Sin embargo, Seneviratne & Wijesekara (1996), encontraron que diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, promovían más el oscurecimiento de brotes de *Hevea brasiliensis*, con relación al dicloruro de mercurio.

El gráfico también señala dos tratamientos con  $\text{HgCl}_2$  cercanos al punto de inercia, en los que la desinfección fue superior al 80%; fueron los tratamientos  $\text{HgCl}_2$  0,125% por 5' y  $\text{HgCl}_2$  0,2% por 10', ambos en presencia de carbón activado (TDS12 y TDS14 respectivamente), aunque en este último, el valor de su contribución para la modalidad "oxidado", es inferior con relación al valor obtenido en el tratamiento TDH12 como se observa en la tabla 4.

Como se observa en la tabla anterior el tratamiento TDS14 es más efectivo para controlar la contaminación por estar más cerca al origen sin embargo, la oxidación es mucho más alta (60%) con relación al tratamiento TDS12 (10%), en el que a pesar de tener una tasa de contaminación mayor, el número de explantes necrosados es menor.

Dobránszki & Teixeira (2010), en su revisión, mencionan lo eficaz que es suplementar inicialmente el medio de cultivo con carbón activado para evitar el oscurecimiento de los explantes, ya que este proporciona un ambiente oscuro e inactiva las peroxidasas y polifenol oxidasas, lo que se traduce en el aumento de material sobreviviente. Esto se pudo demostrar en el trabajo cuando se adicionaron 3 g/l de CA, al medio de cultivo, con lo cual se redujo considerablemente la oxidación y posterior muerte de los explantes. De esta forma se aconseja desinfectar los segmentos nodales de *A. polyneuron*, con  $\text{HgCl}_2$  a una concentración de 0,125% por 5 minutos y suplementar el medio de cultivo con carbón activado.

En el explante láminas foliares no se requirió realizar tratamientos de doble desinfección y las concentraciones y tiempos de exposición al dicloruro de mercurio fueron una de las más bajas; por lo que se

concluye que las hojas responden positivamente a los tratamientos de desinfección, minimizando los efectos de la oxidación y contaminación microbiana.

En la figura 3, el mapa perceptual muestra la relación de los tratamientos de desinfección empleados en láminas foliares de *A. polyneuron*, el cual presenta una composición diferente a los obtenidos anteriormente, ya que se contempla un mapa más despejado pues no se registran grandes agrupaciones alrededor del origen, reflejando de esta forma que en las hojas, la contaminación y oxidación no fueron tan marcadas como en los otros explantes evaluados.

El mapa confirma nuevamente lo sucedido con los otros explantes, en donde las tasas más altas (mayor a 80%) de desinfección y oxidación, se observaron cuando el desinfectante fue el dicloruro de mercurio. Sin embargo, el  $\text{NaClO}$ , funciona mejor que otros desinfectantes, como lo estudió Montes (2004), cuando compara el uso de  $\text{NaClO}$  en hojas de *Anthurium andreaeanum*, con el  $\text{CaClO}$ .

Se observa también que dos tratamientos en los que se usó dicloruro de mercurio, son los más próximos al origen con la modalidad "no contaminado",  $\text{HgCl}_2$  al 0,125% por 10' (TDH6) y  $\text{HgCl}_2$  al 0,2% por 10' (TDH10), aunque este último, mostró una mayor oxidación, lo que se reconoce en el mapa perceptual al colocarse en un punto más cercano al origen.

Como muestra la tabla 5, el tratamiento TDH10 es más eficaz en el control de la contaminación de láminas foliares sin embargo, se aumenta la oxidación, la cual es menor en el tratamiento TDH6, en el que este fenómeno no es tan marcado.

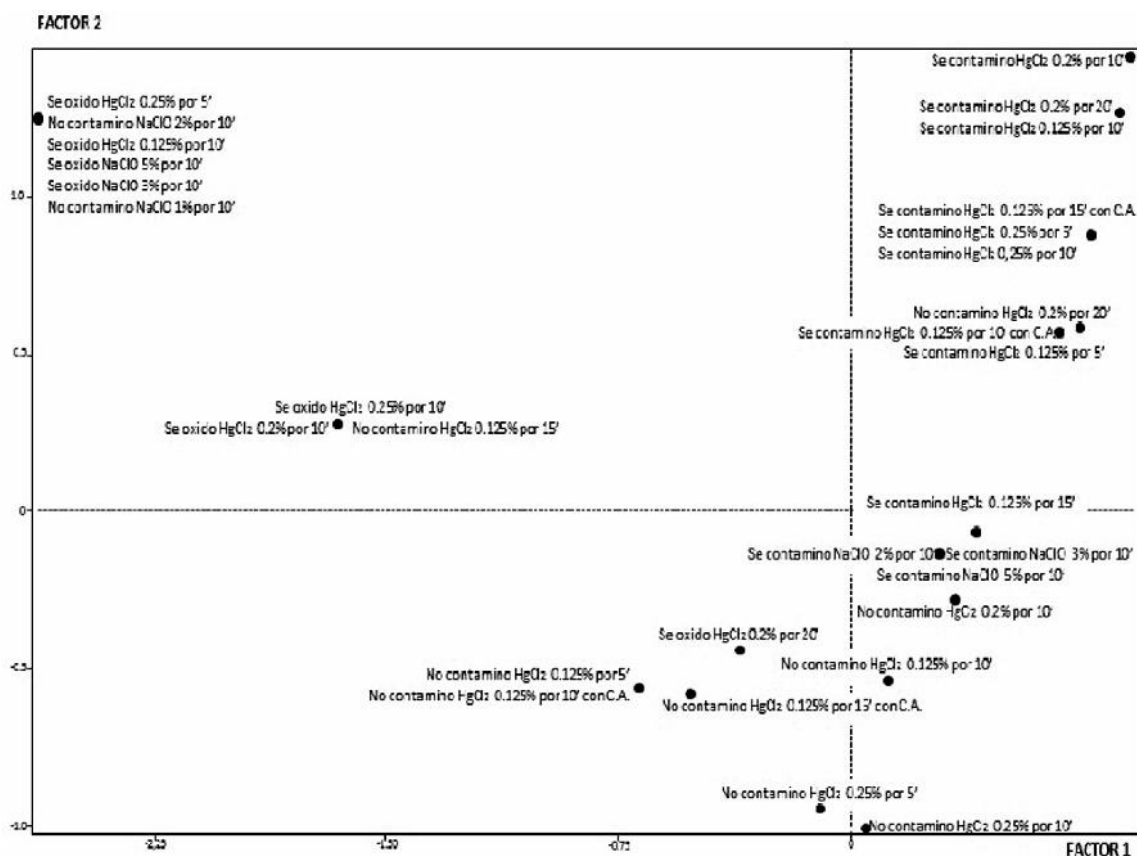
En concordancia con lo afirmado por Torres et al. (1998) citado por Alves Dos Santos et al. (2010), una desinfección eficaz es aquella en la que los explantes que han sido expuestos a una baja concentración desinfectante, presentan tasas reducidas de contaminación microbiana y oxidación. Los tratamientos TDH10 y TDH6, presentaron resultados muy similares, pero se escoge, para los posteriores ensayos de desinfección de lámina foliares de *A. Polyneuron*, el tratamiento

**Tabla 4.** Valor de las contribuciones para los tratamientos TDS12 y TDS14 en las modalidades "no contaminado" y "oxidado" sus respectivos porcentajes de contaminación y oxidación.

Modalidad	No contaminado		Oxidado		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de oxidación
Tratamiento	F1	F2	F1	F2		
TDS12	0,2	4,2	7,2	0,6	30%	10%
TDS14	0,5	0,3	0,6	2,8	10%	60%

Fuente: Autores





**Figura 3.** Mapa perceptual que refleja la asociación de los tratamientos de desinfección empleados en láminas foliares de *A. polyneuron*.

**Fuente:** Autores

**Tabla 6.** Valor de las contribuciones para las modalidades “contaminado”, “no contaminado” y “oxidado”, para los tratamientos TDA21, TDS12, TDH6.

Modalidad	Conta-minado		No conta-minado		Oxidado		Porcentaje de contaminación	Porcentaje de oxidación
	F1	F2	F1	F2	F1	F2		
TDA21*	No presenta		0,6	0,1	5,1	0,7	0%	10%
TDS12**	0,8	6,0	0,2	4,2	7,2	0,6	30%	10%
TDH6***	1,8	6,5	0,1	4,1	8,0	3,1	20%	10%

**Fuente:** Autores

\* Tratamiento de desinfección empleado en ápices

\*\* Tratamiento de desinfección empleado en segmentos nodales

\*\*\* Tratamiento de desinfección empleado en láminas foliares

que más inconvenientes presentó en el proceso de desinfección. En cuanto a los procesos de oxidación, los tres explantes utilizados en el estudio, presentaron el mismo porcentaje (10%) considerado bajo y no limitante para el establecimiento del cultivo.

Si se tiene en cuenta que la lámina foliar presentó una contaminación moderada respecto a los otros dos explantes, la menor oxidación y la mayor producción

de callo, situación que se buscaba como un resultado positivo para continuar los estudios de embriogénesis indirecta en *A. polyneuron*, se escoge, por esta razón, la lámina foliar como explante ideal.

El dicloruro de mercurio fue más eficiente que el hipoclorito de sodio en el control de la contaminación en explantes de *A. polyneuron*, resultados que concuerdan con los realizados por Ribas et al. (2003) sin em-

bargo, este es un producto muy tóxico y activo a bajas concentraciones, presenta acción carcinogénica, afecta principalmente las glándulas mamarias y el sistema reproductor femenino, así mismo daños a nivel del sistema nervioso central. Puede causar quemaduras cuando está en contacto con la piel y es corrosivo para los ojos, además puede llegar a ocasionar serios problemas en el sistema respiratorio cuando este producto es inhalado. (Smith, 2013). Se recomienda evitar su eliminación por el drenaje, ya que este compuesto se biocumula a lo largo de la cadena alimentaria y tiene efectos prolongados en el medio ambiente.

## Conclusiones

El explante seleccionado por su capacidad de producir callos friables y de color verde fue la lámina foliar, para la cual, una desinfección con dicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0,125% durante 10 minutos, fue suficiente para el control de la contaminación y bajos índices de oxidación.

En caso de utilizarse como explante el ápice caulinar se debe implementar una doble desinfección, así: a las yemas completas una vez tomadas de la planta madre, se sumergen en  $\text{HgCl}_2$  al 0,3% por 10 minutos y posteriormente, luego de la eliminación de pérulas y primordios foliares más externos, en  $\text{HgCl}_2$  al 0,1% por 1 minuto.

## Agradecimientos

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS y al Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima, por la financiación de este proyecto.

## Referencias

Abdelnour, A., Aguilar, M. E., & Valverde, L. (2011). Micropropagación de Pilón (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*, 35(2), 9-19.

Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhili, M., & Udupa, S. M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 997-1002.

Alves Dos Santos, M. R., Rodrigues Ferreira, M. D. G., De Oliveira Correia, A., & Félix Da Rocha, J. (2010). *In vitro* establishment and callogenesis in shoot tips of Peach Palm. *Revista Caatinga*, 23(1), 40-44.

Damasceno, J. O., Ruas, E. A., Rodrigues, L. A., Ruas, C. F., & Bianchini, E. (2011). Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers. *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 1180-1187. doi:10.4238/vol10-2gmr1126.

Del Valle, J. I. (1972). Introducción a la dendrología de Colombia. Medellín: Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. p. 351.

Dobránszki, J., & Teixeira, J. A. (2010). Micropropagation of apple A review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.008.

Ezcurra, C., Endress, M., & Leeuwenberg, A. (1992). Flora del Paraguay No. 17, Apocynaceae. Geneva, Switzerland: Conservatoire et Jardin Botaniques. p. 121.

Hodson de Jaramillo, E., Ramírez, C., Schuler, I. (2004). Biotecnología y producción forestal sostenible. En: Conferencia Internacional de Bosques, Colombia: País de Bosques y Vida, Santa Marta. Memorias. Bogotá D. C. Saile, P. y M. Torres (eds). pp. 251-256.

López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivel, A., Aguirre-Medina, J. F., ... & Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotecnica mexicana*, 33(3), 205-213.

Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators' Society*, 30, 421-427.

Montes, S; Morales, C.; Bell, E. (2004). Regeneración de plantas de *Anthurium andreanum* Lind mediante el empleo del cultivo *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, num. Sin mes, pp. 5-7.

Mozo Morron, T. (1972). Algunas especies aptas para la reforestación en Colombia: Editorial A.B.C. Bogotá, D.C. p. 297

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Pedroza-Manrique, J. A., González-Molina, S. R., & Téllez-Ortiz, D. C. (2007). Micropropagación de *Dodonaea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 33-44.

PROEXPO. (1970). Maderas de Colombia. Editorial Fondo de promoción de exportaciones. Bogotá, D.C. p. 117.

Ribas, L. L., Zanette, F., Kulchetski, L., & Guerra, P. M. (2005). Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. *Revista Árvore, Viçosa-MG*, 29(4), 517-524.

Ribas, L. L., Zanette, F., Kulchetski, L., & Guerra, P. M. (2003). Establecimiento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. *Ciência Florestal*, 13(1), 115-122 .

Sakita, A. E., Silva, A., & Paula, R. C. De. (2007). Germinação de sementes de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (peroba-rosa) sob diferentes condições de qualidades de luz e temperatura. *IF Sér. Reg.* (31), 203-207.

Salinas, N., & Cárdenas López, D. (2007). CARRETO: *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. In D. L. Cárdenas, Salinas, & N. R. (Eds.), Libro rojo de plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas: primera parte. Bogotá, D.C.: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. pp. 118-121.

Seneviratne, P., & Wijesekara, G. (1996). The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crops*, 24(1), 54-62.

Smith, R. (2013). Contamination. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. Third Edition. United States of America: Elsevier. pp. 53-61. Retrieved from books.google.com.co/books. isbn=0124159850. Fecha de consulta: Noviembre, 2012.

Toro Carcamo, M. E. (2004). Establecimiento de protocolos para regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) var. Lambert. Tesis PhD. Ingeniería Agrícola, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Escuela de Agronomía. Universidad Católica de Temuco. Chile.

Torres, C. A.; Caldas, S. C.; Buso, A. B. (1998). Meios nutritivos. In: Caldas, L. S.; Haridasan, P.; Ferreira, M. E. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPH/EMBRAPA-SPI, p. 102- 106.

Valeiro, A. F., Farinha Watzlawick, L., Tabolka dos Santos, R., Silvestre, R., & Soares Koehler, H. (2008). Determinação da densidade básica da madeira de peroba (*Aspidosperma polyneuron* müll. Arg.) ao longo do fuste. *Revista Caatinga*, 21(3), 54-58.

Zibbu, G., & Batra, A. (2010). Effect of adeninesulphate on organogenesis via leaf culture in an ornamental plant: thevetia peruviana (pers) schum. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(2), 1-9.



# Efecto de Dicamba y de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis somática en caña de azúcar

## Effect of Dicamba and 2,4 dichlorophenoxiacetic acid on sugarcane somatic embryogenesis

Beatriz Alvez\*, Maira Oropeza\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54280

### Resumen

El cultivo *in vitro* de la caña de azúcar ha sido establecido en muchas variedades comerciales con el propósito de producir material libre de enfermedades microbianas, conservar germoplasma, detectar resistencia a enfermedades y plagas, etc. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue analizar la efectividad de las auxinas sintéticas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) y ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba), en la inducción del proceso de embriogénesis somática y la regeneración de vitroplántulas de distintas variedades de caña de azúcar (C26670, RB855546, V99245, V756, V781, V0050, CC8592, CC8475). Para esto se cultivaron discos de hojas en fase de macollamiento, de 1 cm de diámetro y 2 mm de grosor, en medio Murashige-Skoog, 1962 (MS) suplementado con 50 ml.l<sup>-1</sup> agua de coco, 30 g.l<sup>-1</sup> sacarosa y dos tratamientos diferentes: 3 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D ó 6.63 mg.l<sup>-1</sup> Dicamba, ambos en completa oscuridad a 25°C, durante 1 mes. Los callos obtenidos se colocaron en medio de regeneración, conteniendo ½ sales MS, 200 ml.l<sup>-1</sup> agua de coco y 60 g.l<sup>-1</sup> sacarosa, incubándose bajo luz continua, 25°C, por 2 meses. El mayor porcentaje de callo embriogénico se obtuvo en medios suplementados con Dicamba un promedio de 70,83 % de callo embriogénico por variedad ; mientras que en los medios con 2,4D se obtuvo 62,08 % de callo embriogénico por variedad. Se obtuvo un promedio de 89,00 % de plantas regeneradas a partir de los callos obtenidos en medios con Dicamba y 66,12 % de plantas a partir de callos obtenidos en medios con 2,4D. Con el uso de Dicamba se estableció un sistema eficiente de embriogénesis somática para estas variedades de caña de azúcar.

**Palabras clave:** cultivo *in vitro*, auxinas, vitroplántulas, *Sacharum* spp., embriogénesis somática.

### Abstract

In order to conserve sugarcane germplasm, produce microbial disease-free material, detect resistance to diseases and pests, etc., *in vitro* propagation of sugarcane has been established in many commercial varieties. In this sense, the aim of this work was to analyze the efficiency of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) and 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba) to induce somatic embryogenesis and regeneration of plantlets from sugarcane varieties C26670, RB855546, V99245, V756, V781, V0050, CC8592, CC8475. For induction of embryogenic callus, leaf discs in tillering stage of 1 cm diameter and 2 mm thick, were inoculated on Murashige-Skoog, 1962 medium (MS), supplemented with 50 ml.l<sup>-1</sup> coconut water, 30 g.l<sup>-1</sup> sucrose and two different treatments: 3 mg.l<sup>-1</sup> 2,4D or 6.63 mg.l<sup>-1</sup> Dicamba, both of them in total darkness at 25 °C, during 1 month. For plant regeneration, embryogenic calli were transferred to ½ MS salts supplemented with coconut water 200 ml.l<sup>-1</sup> and sucrose 60 g.l<sup>-1</sup> and incubated under continuous light, 25 °C, for 2 months. The highest percent of embryogenic callus induction was obtained in media supplemented with Dicamba, an average of 70.83 % of embryogenic callus by variety, while in media with 2,4-D, 62.08 % of embryogenic callus was obtained by variety. An average of 89,00 % of plantlets was obtained from calli induced on media with Dicamba and an average of 66.12% of plantlets was obtained from calli induced on media supplemented with 2,4D. Using Dicamba it was possible to establish an efficient somatic embryogenesis protocol for these sugarcane varieties.

**Key words:** *in vitro* culture, auxins, vitroplantlets, *Sacharum* spp, somatic embryos.

**Recibido:** enero 26 de 2015

**Aprobado:** octubre 26 de 2015

\* Doctora en Ciencias. Laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos, Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, VENEZUELA. beatriz.alvez@ciens.ucv.ve

\*\* Doctora en Ciencias. Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, VENEZUELA. maira.oropeza@ciens.ucv.ve

## Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es una fuente nutricional de carbohidratos (Cova *et al.*, 2006). y uno de los principales rubros agrícolas en Venezuela, en los estados Aragua, Barinas, Carabobo, Lara, Monagas, Portuguesa, Sucre, Tachira, Trujillo, Yaracuy y Zulia Este cultivo es usado principalmente como materia prima en la producción de azúcar y alcohol (Silva *et al.*, 2005). La caña de azúcar es el cultivo con el mayor volumen de producción a nivel mundial, según lo corroboran los datos reportados hasta el año 2012 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, según sus siglas en inglés), en comparación con otros rubros de alta importancia económica.

Las variedades más cultivadas en el país son V7139, V7151, V6410, CC8325, B64129, B8084, PR692176, PR1013, CP721210, CP722086, CP742005, SP711408, SP701284, CL73239, MZC74275, MZC8-25, C32368, C37167, RAGNAR, MY5514, según los datos del central azucarero El Palmar ubicado en estado Aragua, además de las variedades C26670, RB855546, V99245, V756, V781, V0050, CC8592, CC8475 empleadas en esta investigación.

El mejoramiento de este cultivo se ve limitado por la longitud de tiempo requerido para liberar una nueva variedad al comercio (10 a 14 años); y se ha enfocado en lograr la resistencia a plagas y enfermedades y en aumentar los rendimientos de sacarosa y biomasa. Con el fin de acelerar la mejora de este importante rubro, las investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar comenzaron en los años sesenta, y desde ese momento han sido establecidos diferentes sistemas de regeneración *in vitro* para muchas variedades comerciales (Gnanapragasam y Vasil, 1990; Suprasanna *et al.*, 2011).

Cuarenta años de investigación en el cultivo *in vitro* de caña de azúcar han generado muchos sistemas bien desarrollados que se aplican rutinariamente a las actividades de investigación y comercio, a saber: (a) micropropagación de genotipos, (b) la producción de material libre de enfermedades a partir de meristemas apicales; (c) intercambio internacional de germoplasma, (d) la generación de somaclones, (e) la detección rápida de la resistencia a enfermedades y a las plagas, y (f) la conservación de germoplasma. Hay una amplia gama de protocolos empleados y establecidos para la manipulación *in vitro* de la morfogénesis de la caña de azúcar y las técnicas para la producción masiva de material libre de patógenos ya se han integrado en muchos programas de propagación de caña de azúcar (Snyman *et al.*, 2011; Raza *et al.*, 2012).

En la embriogénesis somática una única célula o un pequeño número de células somáticas son los precursores de la formación de un embrión somático (Silveira *et al.*, 2013). Las hormonas vegetales juegan un papel crítico en el establecimiento de la embriogénesis

somática; durante este proceso las células vegetales reversion su estado de diferenciación adquiriendo pluripotencialidad y determinando un nuevo programa de desarrollo. Un aspecto crítico, es el modo de acción de las hormonas vegetales en el proceso; los estudios señalan que las hormonas vegetales participan en la reprogramación de las células somáticas hacia el destino embriogénico y demuestran una relación entre las hormonas vegetales y las vías moleculares que controlan el proceso: remodelación de la cromatina, cambios en el patrón de expresión génica, reactivación del ciclo de división celular y regulación y modificación de la síntesis proteica (Thomas y Jiménez, 2005).

Para inducir la embriogénesis somática es necesario que en el medio exista cierta concentración de auxinas y citoquininas. Las auxinas pueden inducir la formación de células embriogénicas y promover la división celular repetitiva, mientras que las citoquininas son necesarias para la inducción de la embriogénesis en muchas especies de dicotiledóneas (Abdi y Hedayat, 2011). En general, las auxinas se definen como compuestos con actividad biológica similar al ácido indol acético, incluyendo la habilidad de promover el alargamiento celular en secciones de coleótilos y tallos, la división celular en cultivos de callos en presencia de citoquininas, formación de raíces adventicias en hojas y tallos separados, entre otras. Aunque son químicamente diversas, una característica común de las auxinas activas, es una distancia molecular de 0.5 nm entre una carga positiva fraccional en el anillo aromático y un grupo carboxilo negativamente cargado (Taiz y Zeiger, 2010). La respuesta del explante a la adición exógena de auxinas y citoquininas es variable y depende de la especie de planta, estado de desarrollo del explante (nivel endógeno de estas hormonas) y el tipo y cantidad de auxina y/o citoquinina.

El proceso de embriogénesis somática en diferentes variedades de caña de azúcar ha sido estudiado con el propósito de mejorar la frecuencia en la formación de embriones somáticos de manera directa o a través de una fase de callo (Gallo *et al.*, 2000). Oropeza *et al.* (2001), evaluaron el potencial de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), sobre la producción de callo embriogénico y no embriogénico de la variedad PR62258 de caña de azúcar y analizaron las proteínas relacionadas con el potencial embriogénico en callos y suspensiones celulares de este cultivo. Posteriormente, Marcano *et al.* (2002) demostraron que dos variedades venezolanas de caña de azúcar respondían mejor hacia la embriogénesis somática cuando los callos eran inducidos en medios suplementados con ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba); mientras que la mayoría de los autores reportan que las gramíneas responden mejor hacia la formación de callo embriogénico con 2,4D, ya que es la auxina sintética más empleada, debido a que afecta el crecimiento de las plantas en forma similar y en los mismos órganos que compuestos auxínicos de origen natural.

En este sentido, el objetivo de esta investigación fue analizar la efectividad del 2,4D y del Dicamba en la inducción del proceso de embriogénesis somática y la regeneración de vitroplántulas de distintas variedades de caña de azúcar, tanto venezolanas como extranjeras a fin de evaluar si la respuesta se debe al genotipo de la planta o a la acción de las auxinas consideradas en la investigación.

## **Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

Se emplearon plantas de caña de azúcar de las variedades C26670 (Cuba), RB855546 (Brasil), V99245 (Venezuela), donadas por la estación experimental INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) ubicada en Yaritagua, Edo. Yaracuy, Venezuela; además de las variedades V756, V781 y V0050 (Venezuela), CC8592 y CC8475 (Colombia), donadas por FUNDACANA (Fundación Azucarera para el Desarrollo, la Producción y la Investigación) ubicada en Chivacoa, Edo. Yaracuy, Venezuela. Las características agronómicas más resaltantes que permitieron seleccionar estas variedades para nuestra investigación son: desarrollo fenológico adecuado, germinación, encepamiento y tolerancia a enfermedades.

### **Cultivo in vivo de caña de azúcar**

Los tallos de cada variedad se seccionaron en esquejes con una o dos yemas, que se incubaron en cámara húmeda durante 24 horas y luego se sembraron de forma individual en bolsas con suelo abonado, en condiciones de vivero con humedad relativa promedio de 70%, temperatura promedio de 25 °C. Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño apropiado, entre los 25 y 30 días de crecimiento después del momento de la siembra, se procedió a la escisión de los explantes para el establecimiento del cultivo *in vitro* de todas las variedades.

### **Cultivo in vitro de la caña de azúcar**

#### **a) Obtención de callos embriogénicos**

Se emplearon tallos jóvenes de plantas de 25 a 30 días de edad, provenientes del vivero, a las cuales se les eliminaron las hojas externas y maduras hasta quedar una sección de aproximadamente 5 cm de largo a partir del último nudo, envuelta con las hojas más jóvenes. Este material se lavó con solución jabonosa al 20 %, y se sometió a desinfección con hipoclorito de sodio al 1 % durante 20 minutos (Marcano *et al.*, 2002). En cámara de flujo laminar, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con agua destilada estéril, luego se retiró una última capa de hojas hasta obtener un tallo de aproximadamente 1 cm de diámetro y se seccionaron los explantes a una distancia

del ápice caulinar entre 2 cm hasta 5 cm en forma de discos con 2 mm de grosor, para un total de 30 discos por variedad que se sembraron a razón de 6 explantes por frasco con medio de inducción, compuesto por: sales Murashige y Skoog (1962) completas, inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, piridoxina 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, glicina 2 mg.l<sup>-1</sup>, arginina 50 mg.l<sup>-1</sup>, cisteína 50 mg.l<sup>-1</sup>, ácido cítrico 0,15 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, agua de coco 50 ml.l<sup>-1</sup> y agar 8 g.l<sup>-1</sup>, suplementado con ácido 3,6 dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba) 6,63 mg.l<sup>-1</sup> ó ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) 3 mg.l<sup>-1</sup>, con ajuste a pH 5,7 con soluciones de NaOH 0,1 N y HCl 1 N, y se cultivaron en una habitación bajo condiciones de completa oscuridad a 25°C durante 1 mes (Marcano *et al.*, 2002).

#### **b) Regeneración de vitroplántulas**

Para el desarrollo de plántulas, los callos embriogénicos fueron subcultivados en medio de regeneración, cuya composición es la siguiente: sales Murashige y Skoog (1962) a la mitad, inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 60 g.l<sup>-1</sup>, agua de coco 200 ml.l<sup>-1</sup>, agar 8 g.l<sup>-1</sup> y ajustándose el pH a 5,7 con soluciones de NaOH 0,1 N y HCl 1 N, y se incubaron bajo condiciones de luz continua en una habitación a 25 °C durante 2 meses (Marcano *et al.*, 2002). Se sembraron 5 frascos con 6 callos cada uno, para un total de 30 callos para cada variedad.

#### **c) Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de varianza multifactorial de la interacción entre las variedades de caña de azúcar y las hormonas aplicadas con el programa estadístico Statgraphics Centurion 12®. con variables dependientes (% de formación de callo y % de formación de vitroplántulas) e independientes (hormonas, variedades y réplicas), a fin de evaluar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de formación de callos embriogénicos y entre los porcentajes de desarrollo de vitroplántulas a partir de los embriones somáticos obtenidos. Para identificar cuáles de las variedades de caña de azúcar y cuál de los tratamientos hormonales muestran diferencias significativas, se procedió a aplicar la comparación de medias con el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, con un 95 % de confianza.

## **Resultados y discusión**

### **Cultivo in vitro de caña de azúcar**

El protocolo de desinfección resultó 100% eficiente, dado que no se observó contaminación en ninguna de las fases de cultivo. Los procedimientos de cultivo y propagación *in vitro* se realizaron en una habitación con las condiciones de asepsia adecuadas, equipada con una cabina de flujo laminar, incinerador, instrumentación estéril y medios de cultivo debidamente

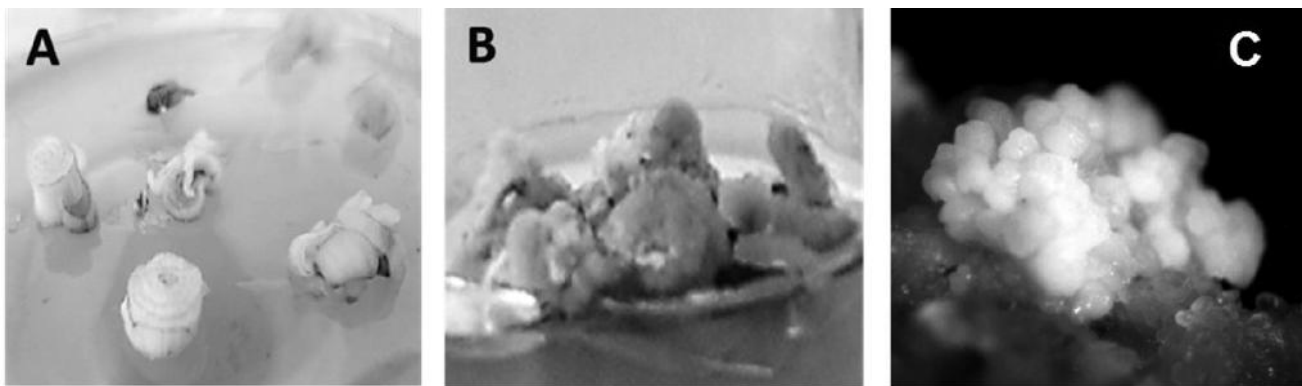
esterilizados. Este logro es sumamente importante si por ejemplo comparamos este resultado con los obtenidos por Mittal *et al.* (2009), quienes reportan la necesidad de usar cefotaxima 500 mg.l<sup>-1</sup>, un antibiótico perteneciente a la familia de las cefalosporinas de tercera generación, como un promotor de la embriogénesis somática y la posterior regeneración de brotes en distintas variedades de caña de azúcar de India y para mantener la asepsia durante el proceso morfogenético. Kour y Kapoor (2015) encontraron que este antibiótico no promovía la embriogénesis somática en las variedades de caña de azúcar CoJg4, CoJ83 y CoJ86. En esta investigación, no hubo necesidad de usar ningún tipo de antibiótico, cuyo uso puede interferir con la morfogénesis de los embriones somáticos además de la incidencia en los costos del establecimiento del cultivo.

#### a) Obtención de callos embriogénicos

Distintos factores genéticos y fisiológicos influyen en la inducción de la embriogénesis somática, desencadenando la sustitución del patrón de expresión génica existente en el tejido del explante, con una nueva expresión de genes embriogénicos. Este proceso sólo es posible si las células son competentes y reciben los estímulos inductores apropiados. Entre los factores que intervienen, las hormonas vegetales, especialmente las auxinas, son componentes clave, ya que su aplicación exógena recapitula el potencial embriogénico de las células somáticas mitóticamente inactivas. Varios estudios han indicado que la señalización por auxinas, así como el estrés pueden ser eventos clave en la reprogramación genética de células somáticas durante la embriogénesis temprana, lo cual es necesario para la indiferenciación y para adquirir la condición embriogénica (Silveira *et al.*, 2013).

En la figura 1, se observan las diferentes etapas del proceso de embriogénesis somática en la variedad de caña de azúcar V99245, en representación de todas

las estudiadas en este trabajo. En la parte A de la figura, se observan los discos foliares inoculados en el medio de inducción de callos. Una vez transcurridos 25 días, se puede observar en la parte B de la figura, la formación de callo de aspecto compacto con una coloración blanquecina, características típicas del callo embriogénico de caña de azúcar (Oropeza *et al.*, 2001). Taylor *et al.*, (1992) proveen una descripción precisa de los diferentes tipos de callo que se originan a partir de segmentos de hojas jóvenes de caña de azúcar: El Tipo I, aparece primero, luego de 5 días de cultivo en los extremos de corte y se caracteriza por ser semi-traslúcido y consistente de células grandes y alargadas; el Tipo II se desarrolla dentro del tejido del Tipo I luego de 13 días de cultivo y es suave, mucilaginoso, amarillento y contiene células redondeadas, vacuoladas altamente disociadas. El Tipo III aparece después de los 13 a 21 días en los extremos de los explantes y alrededor del tejido vascular, consistiendo de un callo compacto, duro, con nódulos globulares superficiales, amarillento al principio pero después se torna blanquecino y está compuesto de células pequeñas, redondeadas y de citoplasma denso. El Tipo IV es amarillo, friable, presenta aglomerados de estructuras semi-organizadas y consiste de células pequeñas, redondeadas, de citoplasma denso. Los callos del Tipo I y Tipo II son no-morfogénicos mientras que los callos Tipo III y IV pueden regenerar plantas con una alta frecuencia a través de la embriogénesis somática y con una baja frecuencia a través de la organogénesis, respectivamente. El callo Tipo III es el referido como callo embriogénico y la heterogeneidad se debe a que el explante proviene de la sección transversal de varias hojas con diferentes grados de madurez. Guiderdoni y Demarly (1988) describieron sólo dos tipos de callo: el callo friable y el callo compacto, los cuales aparentemente concuerdan con los Tipos I y III de Taylor *et al.*, (1992). Resultados similares fueron obtenidos por Oropeza *et al.*, (2001) y por Marcano *et al.*, (2002); observando únicamente los callos compac-



**Figura 1.** Inducción de la embriogénesis somática de la variedad de caña de azúcar V99245 con Dicamba. **A)** Discos de hojas envueltas al inicio de la inducción. **B)** Callo generado luego de 25 días de cultivo en medio de inducción. **C)** Callos mostrando agregados embriogénicos a los 32 días de incubación en medio de inducción (110X).



to y friable, de acuerdo a lo descrito por Guiderdoni y Demarly (1988). Silveira *et al.* (2013) estudiaron las diferencias en la adquisición de competencias y la posterior maduración del embrión somático en callos embriogénicos y no embriogénicos de caña de azúcar de la variedad SP791011; mediante análisis histológico, curvas de crecimiento, número de embriones somáticos y contenido de poliaminas. Los callos embriogénicos fueron distinguibles de los no embriogénicos por presentar tejidos con forma redondeada, aspecto seco y compacto, de color blanquecino opaco con menor oxidación, además de la aparición de puntos verdes luego de varios días; mientras que los callos no embriogénicos presentaban células alargadas, aspecto suave y friable, mucilaginosos, de color pardo traslúcido por la oxidación en presencia de luz.

En la figura 1C se observan los agregados de embriones formados a partir de los callos embriogénicos, a los 32 días después de la siembra, mostrando el color blanquecino característico. La poca cantidad de callo no embriogénico obtenida presentaba aspecto suave y friable, evidenciando oxidación celular debido a la coloración marrón traslúcida, mientras que los callos embriogénicos mostraban un aspecto más compacto, una coloración opaca y blanquecina, con numerosos embriones somáticos en su periferia, que al transcurrir cinco días comenzaron a germinar observándose gran cantidad de vástagos y raíces. El resto de las variedades presentó el mismo tipo de crecimiento. Aunque no se realizó un estudio histológico para determinar el origen embriogénico de las vitroplántulas, las condiciones de cultivo y la morfología del callo obtenido, fueron similares a las reportadas por Oropeza *et al.*, (2001) y por Marcano *et al.*, (2002) donde corroboraron mediante el estudio anatómico lo observado a nivel morfológico en los callos embriogénicos. Así, dadas las características morfológicas de los callos obtenidos en este trabajo y la alta frecuencia de regeneración de plántulas a partir de estos callos, es muy probable que el principal proceso de regeneración *in vitro* que está ocurriendo sea el embriogénico.

En la tabla 1 se observan los porcentajes de formación de callo embriogénico, para cada variedad, con ambos tratamientos hormonales, los cuales evidencian diferencias significativas entre 2,4D y Dicamba. En cuanto a la respuesta por variedad, se observa una respuesta particularmente baja para la variedad RB855546, con ambos tratamientos, lo cual corrobora el hecho de que toda respuesta embriogénica depende del genotipo. En general, para la variedad V0050 la formación de callo embriogénico es mayor con 2,4D; se observó una respuesta muy similar entre las variedades CC8475, V756 y V781, pero la respuesta oscila entre 40 y 90 %, todas con mayor respuesta con Dicamba; al igual que entre las variedades CC8592 y V99245, estas últimas con la respuesta más alta para formación de callo embriogénico con ambos tratamientos.

**Tabla 1.** Porcentajes de formación de callos embriogénicos de cada variedad de caña de azúcar.

Variedad de caña de azúcar	% Formación de callo embriogénico	
	2,4D	Dicamba
CC8475	40,00 <sup>a,e</sup>	83,33 <sup>b,e</sup>
CC8592	86,67 <sup>a,f</sup>	86,67 <sup>b,f</sup>
C26670	50,00 <sup>a,d</sup>	66,67 <sup>b,d</sup>
RB855546	20,00 <sup>a,c</sup>	16,67 <sup>b,c</sup>
V756	66,67 <sup>a,e</sup>	83,33 <sup>b,e</sup>
V781	73,33 <sup>a,e</sup>	90,00 <sup>b,e</sup>
V0050	66,67 <sup>a,d</sup>	46,67 <sup>b,d</sup>
V99245	93,33 <sup>a,f</sup>	93,33 <sup>b,f</sup>

Comparación de medias con el procedimiento de diferencia significativa (HSD) de Tukey con un nivel de confianza de 95%. Las letras a y b denotan diferencias altamente significativas entre los tratamientos hormonales. Las letras c, d, e, f, representan diferencias altamente significativas entre la respuesta de las variedades ante la formación de callo. Variedades con la misma letra no presentan diferencias significativas entre ellas.

El inicio y el mantenimiento de callo embriogénico es un paso importante para el desarrollo de embriones somáticos y la regeneración de plántulas (Silveira *et al.*, 2013). Tradicionalmente y en la actualidad, la embriogénesis somática en muchas especies de gramíneas, es inducida con 2,4D. Ho y Vasil (1983), reportaron por primera vez que en los extremos cortados de explantes de monocotiledóneas cultivados en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2,4D, se formaban callos (Guiderdoni y Demarly, 1988; Guiderdoni *et al.*, 1995; Suprasanna *et al.*, 2005; Lakshmanan *et al.*, 2005; Raza *et al.*, 2012; Taparia *et al.*, 2012; Kaur y Kapoor, 2015). En nuestra investigación, la inducción del callo embriogénico y de embriones somáticos fue ligeramente mayor en los explantes cultivados en medios suplementados con Dicamba (70,83 % de callo embriogénico por variedad), aunque la mayoría de las variedades respondieron al 2,4D (62,08 % de callo embriogénico por variedad), el porcentaje de formación de callo embriogénico de cada variedad para cada tratamiento se observa detalladamente en la tabla 1. Se observó un rápido desarrollo de callo embriogénico durante la fase de inducción, bajo las condiciones del ensayo, en medios de cultivo suplementados con Dicamba, compuesto que es empleado en condiciones de campo como un herbicida selectivo, su modo de acción es modificar el transporte del ácido indolacético, destruyendo el cámbium y el parénquima a nivel de los nudos o por encima de ellos; pero su estructura química es la de una auxina artificial, la cual empleada en cultivos *in vitro* de caña de azúcar, permite la anaplasia del tejido de discos de hojas envoltentes.

El uso de explantes de hojas jóvenes en nuestra investigación, ha sido validado en distintos protocolos establecidos para la morfogénesis *in vitro* de la caña de azúcar utilizando explantes de diferentes partes de la planta, como por ejemplo meristemas, verticilos de hojas internas, segmentos de inflorescencias, inflorescencias inmaduras, segmentos de hojas jóvenes, discos de hojas inmaduras, entre otros; sin embargo, el más empleado es el disco de hojas envoltantes inmaduras cercanas al meristemo apical, inoculado en sentido horizontal, con sus extremos distales en contacto con el medio, ya que con el uso de este tipo de explante, se han obtenido los mejores resultados en la producción de embriones somáticos (Guiderdoni *et al.*, 1995; Oropeza *et al.*, 2001; Marcano *et al.*, 2002; Suprasanna *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2013). Kaur y Sandhu (2015) establecieron un sistema eficiente de producción directa de yemas adventicias, también a partir de discos de hojas jóvenes; demostrando el potencial de este explante para la producción masiva a nivel industrial, de plantas de caña de azúcar.

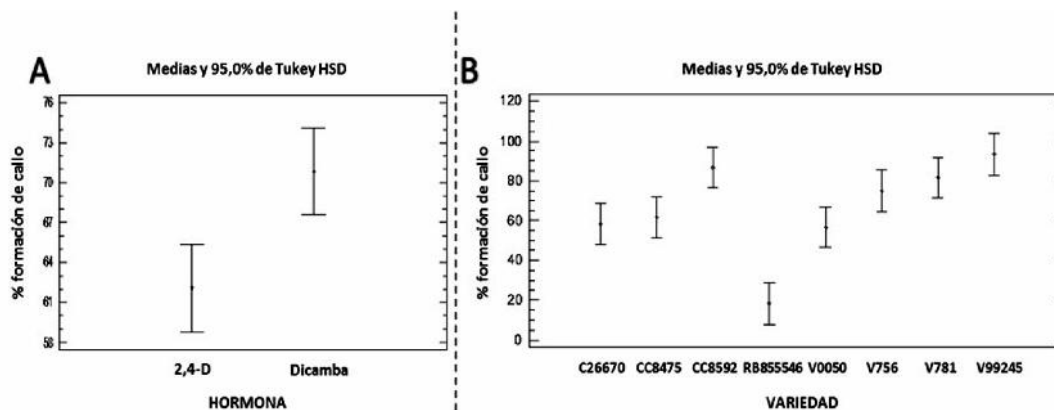
Manchanda y Gosal (2012), estudiaron el efecto del carbón activado, las fuentes de carbono y los agentes gelificantes sobre la embriogénesis somática de caña de azúcar, y recomiendan ampliamente la adición de carbón activado al medio de cultivo, para disminuir el ennegrecimiento de los tejidos por la exudación de compuestos fenólicos y así incrementar el potencial embriogénico de los tejidos. Además, recomiendan suplementar el medio con maltosa, aunque el uso de sacarosa sigue rindiendo buenos resultados. Finalmente recomiendan gelificar los medios de cultivo con agar ya que observaron que con su uso aumentaba el porcentaje de formación de embriones somáticos, así como la frecuencia de regeneración de la caña de azúcar, en comparación con el gelrite. En nuestras manos, no se observó ennegrecimiento por lo que no hizo falta el uso de carbón activado. La poca oxidación

observada fue controlada con la adición de cisteína al medio de cultivo.

Suprasanna *et al.* (2005), encontraron que la eficiencia de formación de callo embriogénico fue más alta con la combinación de 2,4D y zeatina en la variedad Co91010, mientras que para la variedad CoC671, esta combinación resultó eficiente añadiendo prolina al medio de cultivo. Analizando la respuesta particularmente baja de la variedad RB855546, obtenida en nuestra investigación, se podría recomendar suplementar el medio MS (1962) usado para la inducción de callos embriogénicos (que contiene los aminoácidos arginina y cisteína), con prolina a fin de mejorar la respuesta de esta variedad. Por otra parte, en nuestro trabajo no se utilizaron citoquininas sintéticas en combinación con las auxinas probadas para la inducción del proceso de embriogénesis somática; aparentemente, la cantidad de zeatina que contiene el agua de coco, es suficiente para inducir los procesos de división y alargamiento celular, que en combinación con las auxinas, propician las citoquininas durante este proceso.

Marcano *et al.* (2002), optimizaron el proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar, empleando las auxinas sintéticas 2,4D y Dicamba, ambas sustancias empleadas en campo como herbicidas, ya que afectan el transporte de auxinas naturales y el alargamiento celular. Demostraron que después de 45 días en el medio suplementado con Dicamba, se observó el mayor porcentaje de callo embriogénico para las variedades venezolanas ensayadas, V756 y V781.

Como mencionamos antes, numerosos autores han reportado que la embriogénesis somática en caña de azúcar es inducida por la auxina 2,4D (Ho y Vasil, 1983; Brisibe *et al.*, 1994; Falco *et al.*, 1996; Oropeza y García, 1996; Oropeza *et al.*, 2001; Watt *et al.*, 2009; Snyman *et al.*, 2011); sin embargo, en la mayoría de las variedades analizadas en esta investigación, el porcen-



**Figura 2.** Gráficos de análisis de homogeneidad de varianza con 95 % de confianza, mediante comparación de medias por diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, para la formación de callos embriogénicos de caña de azúcar. **A.** tratamientos hormonales; **B.** variedades de caña de azúcar.

taje de callo embriogénico obtenido es mayor cuando se emplea Dicamba, este hecho puede adjudicarse a la diferencia estructural de las moléculas de 2,4D y Dicamba siendo esta última la que puede ser absorbida y degradada por los tejidos vegetales más rápido.

### b) Regeneración de vitroplántulas

La regeneración eficiente de plantas a partir de un sistema de cultivo *in vitro*, es una de las etapas más importante del proceso, que determina la eficiencia del mismo. Además, es el prerequisite esencial para un protocolo completo de transformación genética (Suprasanna *et al.*, 2011; Manchanda y Gosal, 2012).

En la figura 3, se muestra el desarrollo de las plántulas de caña de azúcar de la variedad V99245, una vez que los callos fueron transferidos a medio de regeneración, el cual no contiene hormonas vegetales. En la figura A, se puede ver la formación de vástagos a los 5 días, luego de haber sido transferidos a medio de regeneración, donde se pudo cuantificar aproximadamente un 80% promedio de regeneración de plantas a partir de los callos obtenidos (tabla 2). En la figura B 3, se puede ver el progreso del cultivo, mediante observación de la elongación de los vástagos y la emergencia de las primeras raíces a los 15 días de cultivo en medio de regeneración y luego el incremento en la cantidad de vástagos y raíces formadas a los 20 días, lo cual se puede apreciar en la figura C.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos de regeneración de plántulas, con los callos embriogénicos provenientes de los tratamientos hormonales con 2,4D y Dicamba, donde el Dicamba figura como la hormona más eficiente, ya que los callos generados bajo este tratamiento, presentan un alto porcentaje de regeneración de plántulas completas. En cuanto a las diferencias entre variedades, se pueden distinguir 3 grupos con diferencias altamente significativas; el primer grupo está compuesto sólo por la variedad CC8475, la cual presenta una respuesta muy alta con el tratamiento con Dicamba y muy baja con el tratamiento con 2,4D; el segundo grupo, compuesto por las variedades CC8592, C26670, RB855546, V781 y V0050, no presentan diferencias significativas entre ellas, destacando que todas responden mejor a Dicamba. El último grupo, representado por las variedades V756 y V99245, presentan igualmente una mejor respuesta a Dicamba, sin embargo la respuesta a 2,4D no es despreciable.

La variedad RB855546, no presentó diferencias significativas en cuanto a la formación de callo, con los tratamientos hormonales con 2,4D y Dicamba y los valores de respuesta ante estos tratamientos fue la más baja con respecto a las otras variedades. Sin embargo, al transferir los callos embriogénicos de esta variedad al medio de regeneración de plantas, la respuesta en cuanto a formación de plántulas completas, fue significativamente alta con Dicamba. Esta variedad de caña

de azúcar originaria de Brasil debe ser estudiada con más detalle para poder establecer un sistema eficiente de embriogénesis somática.

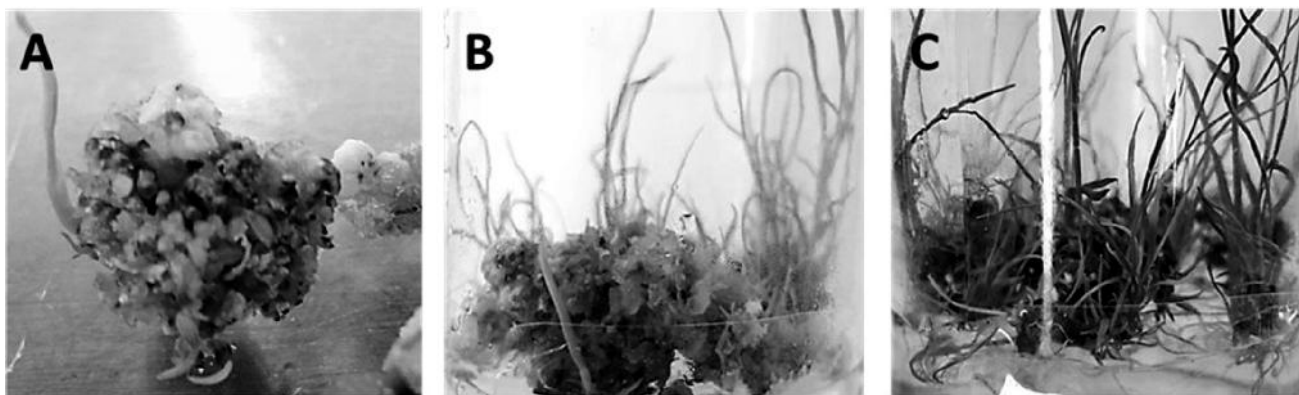
**Tabla 2.** Porcentajes de regeneración de plántulas completas de cada variedad de caña de azúcar.

Variedad de caña de azúcar	% Regeneración de plántulas	
	2,4D	Dicamba
CC8475	33,33 <sup>a,c</sup>	76,00 <sup>b,c</sup>
CC8592	72,67 <sup>a,d</sup>	84,67 <sup>b,d</sup>
C26670	86,67 <sup>a,d</sup>	80,00 <sup>b,d</sup>
RB855546	30,00 <sup>a,d</sup>	100,00 <sup>b,d</sup>
V756	85,00 <sup>a,e</sup>	100,00 <sup>b,e</sup>
V781	69,00 <sup>a,d</sup>	88,00 <sup>b,d</sup>
V0050	75,00 <sup>a,d</sup>	86,67 <sup>b,d</sup>
V99245	77,33 <sup>a,e</sup>	96,67 <sup>b,e</sup>

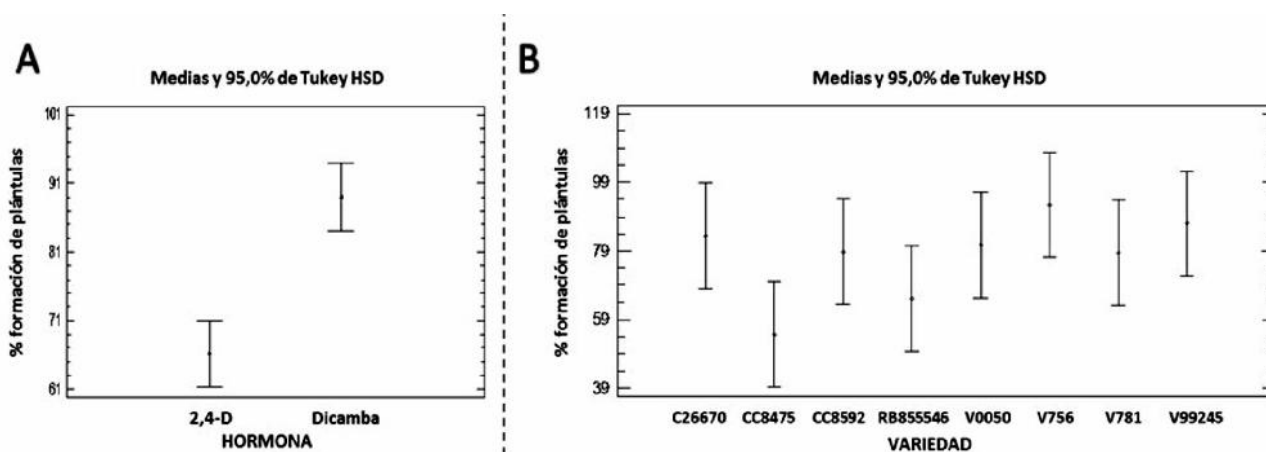
Comparación de medias con el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey con un nivel de confianza de 95%. Las letras a y b denotan diferencias altamente significativas entre los tratamientos hormonales. Las letras c, d, e, representan diferencias altamente significativas entre la respuesta de las variedades ante la regeneración de plántulas completas. No existen diferencias significativas entre las variedades que presentan la misma letra.

La respuesta diferencial de cada variedad, por cada tratamiento hormonal, para la regeneración de plántulas completas de caña de azúcar, se puede evidenciar en la figura 4. donde observa claramente el mayor porcentaje de regeneración de plántulas a partir de los callos inducidos con Dicamba y la agrupación de las variedades antes descrita.

Un análisis en conjunto de la fase de inducción del proceso de formación de callo y la fase de desarrollo de los embriones somáticos y regeneración de vitroplántulas, podemos concluir que el tratamiento con Dicamba es 90 % más eficiente. Se pueden observar diferencias altamente significativas entre los tratamientos hormonales; sin embargo, también se puede observar que de acuerdo a su genotipo, cada variedad presenta una respuesta particular, a pesar que en general, con Dicamba se obtienen los mejores resultados. Marcano *et al.* (2002), demostraron la alta capacidad de regeneración de los callos obtenidos en medio de inducción con Dicamba, al transferirlos a medio de regeneración (sin hormonas), donde a los 4 días ya se observaban los primeros vástagos y al transcurrir 45 días regeneraron plantas completas de caña de azúcar de las variedades V756 y V781. En nuestra investigación, obtuvimos resultados similares, observando los primeros vástagos a los 5 días y la regeneración de plantas completas a los 45 días.



**Figura 3.** Formación de plantas de caña de azúcar, variedad V99245 en medio de regeneración. **A)** Formación de vástagos a los 5 días de cultivo. **B)** Elongación de vástagos y formación de raíces a los 15 días de cultivo. **C)** Elongación de vástagos y raíces a los 20 días de cultivo en medio de regeneración.



**Figura 4.** Gráfico de análisis de homogeneidad de varianza con 95 % de confianza, mediante comparación de medias por diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, para la regeneración de plántulas completas de caña de azúcar. **A.** tratamientos hormonales; **B.** variedades de caña de azúcar.

De acuerdo con nuestros resultados, el tratamiento “Dicamba” fue más efectivo que 2,4D para inducir los callos embriogénicos y la regeneración de plántulas en seis de las ocho variedades estudiadas. Resultados similares fueron obtenidos por Filippov *et al.* (2006) con diferentes cultivares de trigo, donde la exposición con Dicamba resultó en un desarrollo más rápido de los embriones somáticos a partir de callo, en comparación con el 2,4D o el picloram. Algunos autores han reportado este efecto del Dicamba en gramíneas, y en específico en cereales y explican que este regulador de crecimiento sintético tiene un metabolismo rápido en los tejidos mientras que el 2,4D; es una auxina muy estable que muestra una fuerte resistencia a la degradación y conjugación enzimática en las células vegetales. Las auxinas exógenas son necesarias para inducir divisiones mitóticas y alargamiento celular durante la fase de inducción de callo, pero se deben eliminar del medio de cultivo, una vez que han ocurrido

dichas divisiones celulares, para que proceda la morfogénesis embriogénica, es entonces cuando Dicamba presumiblemente se degrada más rápido en el tejido del callo que el 2,4D, por lo que la germinación de los embriones somáticos ocurre más temprano y de manera más eficiente, en los medios suplementados con Dicamba (Filippov *et al.*, 2006). Se ha observado una fuerte influencia del genotipo entre muchos tipos de explantes y muchas especies. Estas diferencias han sido asociadas con las variaciones en susceptibilidad a la programación y reprogramación genética de las células embriogénicamente competentes, entre los diferentes genotipos (Filippov *et al.*, 2006). Igualmente Kaur y Kapoor (2015) demostraron la influencia del genotipo para la formación de embriones somáticos en las variedades de caña de azúcar CoJ64, CoJ83 y CoJ86.

Finalmente, los resultados de esta investigación permiten recomendar el uso de Dicamba para la inducción



del proceso de embriogénesis somática en diferentes variedades de caña de azúcar, y la regeneración de vitroplántulas en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento. El protocolo establecido garantiza la disponibilidad de material suficiente y lo más importante, libre de patógenos, bajo condiciones ambientales totalmente controladas, para conservar el germoplasma de variedades de caña de azúcar de diferentes orígenes geográficos y para aplicar técnicas de avanzada para el mejoramiento de este importante cultivo.

## Conclusiones

El análisis estadístico demostró que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos hormonales, siendo Dicamba, el regulador de crecimiento más eficiente para la inducción de la embriogénesis somática en caña de azúcar.

La respuesta de las variedades de caña de azúcar a los tratamientos hormonales, es genotipo dependiente. Las variedades V99245, CC8592, V781 y V756, presentaron la mejor respuesta ante el proceso de inducción de embriogénesis somática con Dicamba. Las variedades V756, C26670, V99245 y V0050, alcanzaron los mayores porcentajes de regeneración de vitroplántulas.

Con esta investigación se estableció un sistema eficiente de embriogénesis somática en variedades de caña de azúcar provenientes de programas de mejoramiento de diferentes países.

## Perspectivas sobre investigaciones futuras

Validar el uso de Dicamba como la auxina sintética de mayor eficiencia al establecer la embriogénesis somática en todas las variedades venezolanas de caña de azúcar.

Incluir todas las variedades venezolanas de caña de azúcar en un banco de germoplasma a fin de crear un programa de certificación de semillas nacional, sacando el máximo provecho del sistema de cultivo *in vitro*.

## Agradecimientos

Proyecto de Grupo PEII N° 20121357 "Identificación molecular de patógenos y propagación masiva de plantas como herramientas útiles para el programa de certificación de semillas en Venezuela".

## Referencias

Abdi, G., Hedayat, M. (2011). Induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo and immature seed of royal Poinciana (*Delonix regia*). *World Applied Science Journal*, 13, 391-395.

Brisibe, E., Miyake, H., Tanaguchi, T., Maeda, E. (1994). Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *New Phytology*, 126, 301-307.

Cova, J., Nass, H., Orozco, A. (2006). Enfermedades de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) presentes en el estado Portuguesa durante el período 2003-2005. CENIAP HOY. N° 10. Disponible *on line* en: [www.ceniap.inia.gov.ve](http://www.ceniap.inia.gov.ve) (20/04/2007).

Falco, M., Janussi, B., Neto, T. (1996). Cell suspension culture of sugarcane: Growth, management and plant regeneration. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 8, 1-6.

FAO. (2014). Estadísticas de los cultivos más importantes del mundo. Disponible *on line* en: <http://www.fao.org> (10/03/2014).

Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D., Dolgov, S. (2006). The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 213-222.

Gallo, M., English, R., Abouzid, A. (2000). Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 36, 37-40.

Guiderdoni, E., Demarly, Y. (1988). Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 71-88.

Guiderdoni, E., Merot, B., Eksomtramage, T., Paulet, F., Feldmann, T., Glaszmann, J. E. (1995). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* species). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 31. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II (Ed. by Y.P.S. Bajaj). ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 92-113.

Gnanapragasam, S., Vasil, I. (1990). Plant regeneration from a cryo-preserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Report*, 9, 419-423.

Ho, W., Vasil, I. (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118, 169-184.

Joshi, S., Jain, M., Tillman, B., Altpeter, F., Gallo, M. (2013). Comparative analysis of direct plant regeneration from immature leaf whorl and floral explants for three elite US sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 49, 674-681.

Kaur, R., Kapoor, M. (2015). Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane. *Sugar Tech*. Disponible *on line* en: <http://www.researchgate.net> (10/05/2015).

Kaur, A., Sandhu, J. S. (2015). High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agri-business industry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, 339-350.

Lakshmanan, P., Geijskes, J., Aitken, K., Grof, C., Bonnett, G., Smith, G. (2005). Invited Review: Sugarcane Biotechnology: The challenges and opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41, 345-363.

Manchanda, P., Gosal, S. (2012). Effect of activated charcoal, carbon sources and gelling agents on direct somatic embryogenesis and regeneration in sugarcane via leaf roll segments. *Sugar Technology*, 14, 168-173.

Marcano, A., Molina, P., Oropeza, M., de García, E. (2002). Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. *Acta Científica Venezolana*, 53, 251-257.

Mittal, P., Gosal, S., Senger, A., Kumar, P. (2009). Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. *Physiology Molecular and Biology Plants*, 15, 257-265.

- Murashigue, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 173-197.
- Oropeza, M., García, E. (1996). Somaclonal variants resistant to sugarcane mosaic virus and their agronomic characterization. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 32, 26-30.
- Oropeza, M., Marciano, A., García, E. (2001). Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 37, 211-216.
- Raza, S., Qamarunisa, S., Hussain, M., Jamil, I., Anjum, S., Azhar, A., Ahmed, J. (2012). Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. *Journal Crop Science Biotechnology*, 15, 131-136.
- Silva, M., Bedendo, I., Casagrande, M. (2005). Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal escaldadura da cana de açúcar. *Summa Phytopathology*, 33, 341-347.
- Silveira, V., Martins, A., Ferreira, A., Ribeiro, M., Segal, E., Santa, C. (2013). Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, 351-364.
- Snyman, S., Gwethlyn, M., Aimee, C., Marzena, B., Paula, M. (2011). Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 47, 234-249.
- Suprasanna, P., Choudhary, R., Desai, N., Bapat, V. (2005). Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane. *Sugar Technology*, 7, 123-128.
- Suprasanna, P., Patade, V. Y., Desai, N. S., Devarumath, R. M., Kawolr, P. G., Pagariya, M. C. & Babu, K. H. (2011). Biotechnological developments in sugarcane improvement: an overview. *Sugar Technology*, 13(4), 322-335.
- Taylor, PWJ, Ko, HL, Adkins, SW, Rathus, C, Birch, RG (1992). Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 69-78.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Fifth edition. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. p 782.
- Taparia, Y., Gallo, M., Altpeter, F. (2012). Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, 131-141.
- Thomas, C., Jiménez, V. (2005). Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: Molecular aspects. *Plant Cell Monographs*, 2, 157-175.
- Watt, M., Banasiak, M., Reddy, D., Albertse, E., Snyman, S. (2009). *In vitro* minimal growth storage of *Saccharum* spp. hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96,263-271.

# Prototipo de formulación y atmósfera de empaque para la cepa antagonista *Pseudomonas fluorescens* Ps006

## Formulation prototype and atmosphere packaging for the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* PS006

Carolina Ruiz\*, Martha Gómez\*\*, Laura Villamizar\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54282

### Resumen

El aislamiento *Pseudomonas fluorescens* Ps006 demostró alto potencial para ser usado como principio activo de un bioinsumo, por su capacidad para producir biosurfactantes, actividad solubilizadora de fósforo y antagonista ante diferentes fitopatógenos. Por tal razón, el presente trabajo tuvo como objetivos desarrollar y caracterizar un prototipo de formulación a base de *P. fluorescens* Ps006, estable bajo condiciones de almacenamiento. Inicialmente se caracterizó el principio activo y se seleccionaron los auxiliares de formulación compatibles con el mismo, evaluándose la estabilidad de su mezcla con tres soportes sólidos, a dos humedades diferentes (10% y 20%) durante tres meses de almacenamiento a temperaturas de 8, 18 y  $28 \pm 2$  °C. El principio activo demostró actividad antagonista *in vitro* sobre cuatro fitopatógenos y la temperatura y la humedad afectaron su estabilidad durante el almacenamiento. A los prototipos de formulación más estables en cuanto a viabilidad y actividad biocontroladora se les evaluó su estabilidad en presencia y ausencia de oxígeno y de protectores de membrana. Se seleccionó el soporte S1 al 20% de humedad mezclado con el principio activo sin adición de protectores de membrana y almacenado en presencia de oxígeno, por ser el tratamiento más estable durante seis meses de almacenamiento a tres temperaturas, con pérdidas de viabilidad inferiores al 5%.

**Palabras clave:** control biológico, formulación, *Pseudomonas* spp, vida útil.

### Abstract

The isolation *Pseudomonas fluorescens* PS006 demonstrated high potential to be used as an active ingredient of a bioproduct, because its capacity to produce biosurfactants, its phosphorus solubilizing activity and its antagonistic activity over different phytopathogens. For this reason, the present work had as objectives to develop and characterize a formulation prototype based on *P. fluorescens* PS006, stable under storage conditions. Initially the active ingredient was characterized and compatible formulation auxiliaries, were selected evaluating the stability of its mixture with three solid diluents at two different moistures (10% and 20 %) during three months of storage at temperatures of 8, 18 and  $28 \pm 2$  °C. The active ingredient showed *in vitro* biocontrol activity over four phytopathogens and temperature and humidity affected its stability during storage. Stability of the most stable formulation prototypes in terms of viability and biocontrol activity was evaluated in presence and absence of oxygen and membrane protectors. Support S1 with 20% of moisture mixed with the active ingredient without addition of membrane protectors and stored in presence of oxygen, was selected as the most stable treatment during six months of storage at three temperatures, with viability losses lower than 5%.

**Key words:** biological control agent, biocontrol, formulation, *Pseudomonas* spp, shelf-life.

**Recibido:** noviembre 18 de 2014      **Aprobado:** octubre 20 de 2015

\* Microbióloga Industrial, Investigador Profesional, Laboratorio de Control Biológico, Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. jcrui@corpoica.org.co

\*\* PhD, Directora Planta de Bioproductos, Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. mgomez@corpoica.org.co

\*\*\* PhD, Investigador PhD, Laboratorio de Control Biológico, Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. lvillamizar@corpoica.org.co

## Introducción

*Pseudomonas fluorescens* es una bacteria con alto potencial para el control biológico de diversos microorganismos fitopatógenos, debido a sus múltiples mecanismos de acción, tales como la inducción de resistencia sistémica, la producción de sideróforos, la competencia por espacio y nutrientes y la producción de diversos metabolitos entre los que se destacan la pioluteorina, el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), la pirrolnitrina, el ácido cianhídrico y otras metaloenzimas, (Loper & Gross, 2007; Anjaiah, 2006; Manikandan et al., 2010; Siddiqui, & Shaukat, 2003). Algunas de las enfermedades sobre las cuales *P. fluorescens* ejerce control son el añublo de la vaina del arroz (*Oryza sativa* L.) causada por *Rhizoctonia solani* (Commare et al., 2002; Rabrindran & Vidhyasekaran, 1996), el marchitamiento del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) causado por *Fusarium oxysporum* (Manikandan et al., 2010; Valencia et al., 2005), la mancha bacteriana en tomate causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Kamal et al., 2008), la podredumbre de la fruta y el moho del chile causados por *Colletotrichum capsici* y *Leveillula taurica* respectivamente (Anand et al., 2010) y la marchitez causada por el hongo del suelo *Verticillium dahliae*, enfermedad responsable de grandes pérdidas económicas en cultivos como el algodón (*Gossypium* sp. L) (Erdogan, & Benlioglu, 2010).

*P. fluorescens* como otros microorganismos es susceptible a diferentes condiciones ambientales, en particular la temperatura y el pH (O'Callaghan et al., 2006). Por tales razones para su implementación eficiente como herramienta de control biológico, es necesario desarrollar productos cuya formulación asegure su eficacia y estabilidad en almacenamiento (Burgess, 1998).

A nivel mundial existen múltiples productos con *P. fluorescens* como principio activo, los cuales están formulados para el control biológico de diferentes fitopatógenos (Hernández-Rodríguez et al., 2008; Hernández-Rodríguez et al., 2014). Entre estos productos se encuentran BioCure-B® recomendado para el control de *Mycosphaerella graminicola*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, y *Sclerotinia homoeocarpa* (T-Stanes & Company Limited, s.f) y BlightBanA506® formulado como polvo mojable efectivo para el control de *Erwinia amylovora* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y tomate (Copping, 2009), entre otros tantos productos.

La cepa autóctona *P. fluorescens* Ps006 tiene la capacidad de producir biosurfactantes, actividad solubilizadora de fósforo, actividad zoosporicida y potencial para el control biológico de patógenos al evidenciarse una reducción en el índice de severidad (IS) de *O. virulentus* (IS de 0,6) en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en comparación con el testigo patógeno (IS de 4,7). Además, esta bacteria aplicada a una concentración de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> favoreció e incrementó

significativamente la longitud y ancho de las hojas, la biomasa seca de la parte aérea, al igual que el desarrollo en longitud y la biomasa seca de la raíz de plantas de fique, demostrando un efecto promotor del crecimiento vegetal (Smith et al., 2013). Teniendo en cuenta dichas características, este trabajo tuvo como objetivos desarrollar un prototipo de formulación polvo mojable (WP) usando *P. fluorescens* Ps006 como ingrediente activo y seleccionar la atmósfera de empaque más favorable para mantener la viabilidad del microorganismo.

## Materiales y métodos

### Microorganismo y conservación

Se utilizó el aislamiento de *P. fluorescens* Ps006, obtenido a partir de la rizosfera de fique *Furcraea andina* (Trelease 1808) en el municipio de Totoró (2° 38' N y 2° 15' W, a 2,750 m.s.n.m, y 14 °C), en el departamento del Cauca, Colombia (Sastoque, 2010). El microorganismo fue conservado en solución salina (0,85% de NaCl) con glicerol al 10% y peptona al 0,10%, a -70 ± 2 °C.

### Producción y caracterización del principio activo de *P. fluorescens* Ps006

*P. fluorescens* Ps006 se sembró en medio agar Luria Bertani – LB (Oxoid CM1021) y se incubó por 48 horas a 28 ± 2 °C. A partir de este cultivo se preparó una suspensión celular en Tween 80 al 0,5% y se inoculó en un erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio LB. La concentración de la suspensión se estimó leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 300 nm y dicho valor se extrapoló en una curva patrón estandarizada previamente. La fermentación se realizó utilizando una agitación constante de 175 rpm a 28 ± 2 °C por 48 horas.

Se realizaron 3 lotes de fermentación que se caracterizaron determinando la concentración celular en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), el pH y la actividad biológica *in vitro*, por triplicado para cada lote.

La concentración bacteriana se determinó mediante recuento en placa, sembrando tres diluciones decimales del caldo de fermentación por triplicado, en cajas Petri con medio LB e incubando durante 24 horas a 28 ± 2 °C, momento en el cual se realizó el recuento de UFC/ mL. Una vez se verificó la normalidad (Shapiro Wilk 95%) y la homogeneidad de varianza (Prueba de Barlett 95%) de los datos, se realizó un análisis de varianza ANOVA y una comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Se empleó el programa estadístico Statistix 8.0.

El pH de los tres lotes de fermentación se midió con un potenciómetro marca Hanna® Instruments previamen-



te calibrado. Se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación de los datos.

La actividad biológica *in vitro* se estimó como la inhibición del crecimiento de cuatro reconocidos fitopatógenos (Raut *et al.*, 2012) mediante la técnica de cultivo dual (Shi *et al.*, 2014). Para ello se utilizaron las cepas *F. oxysporum* MAP5 aislado de uchuva (*Physalis peruviana* L.), *R. solani* Rh200 aislada de papa (*Solanum tuberosum*), *B. cinerea* Bc008 aislada de mora (*Rubus* sp. L.), y *Sclerotinia sclerotiorum* Sc021 aislada de papa (*Solanum tuberosum*). Para esta determinación se sembraron en superficie en medio agar PDA muestras de 100  $\mu$ L de los tres lotes de fermentación y se colocó sobre el punto central del medio inoculado un disco de 5 mm de diámetro de medio de cultivo crecido con los hongos fitopatógenos de 8 días de edad. Se utilizaron tres unidades experimentales (cajas de Petri) para cada tratamiento. El tratamiento control consistió en medio agar PDA sin inóculo bacteriano, pero inoculado con los hongos fitopatógenos de la forma descrita previamente. Las cajas de Petri se incubaron 8 días a  $25 \pm 2$  °C y transcurrido dicho tiempo, el valor de crecimiento diametral medio de cada colonia fue determinado calculando la longitud promedio de 4 líneas rectas que trazadas de un extremo a otro de la colonia, pasan por su centro y la dividen en octantes (Pradeep *et al.*, 2013).

### Selección de soportes sólidos compatibles

Se evaluaron tres soportes sólidos en polvo denominados S1 (arcilla), S2 (silicato) y S3 (estearato), cada uno a dos condiciones de humedad diferentes (10% y 20%) e inoculados con el principio activo a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL. La humedad de los soportes al 10% fue aportada por el principio activo mezclado, mientras que para ajustar el 20% y mantener la misma concentración celular se adicionó una solución tampón pH 7,5. Posteriormente se dispensaron muestras de 1 g de soporte inoculado con el principio activo en viales de vidrio previamente esterilizados, los cuales se sellaron con tapones de caucho y agrafes metálicos y se almacenaron a diferentes temperaturas ( $8 \pm 2$  °C,  $18 \pm 2$  °C y  $28 \pm 2$  °C). Antes de iniciar el almacenamiento y pasados uno, dos y tres meses, se evaluó la viabilidad de *P. fluorescens* Ps006 por el método de recuento en placa descrito previamente (resultados expresados en UFC/g). La muestra contenida en cada vial se mezcló con 9 mL de Tween 80 al 0,5 % y se agitó para su posterior siembra en medio de cultivo LB. Se siguió un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. En cada tiempo de medición se evaluaron dos muestras de cada tratamiento por triplicado. Se seleccionaron los tratamientos en los cuales se obtuvo una mayor viabilidad y estabilidad del principio activo en los tres meses de almacenamiento.

### Evaluación de coadyuvantes y atmósfera de empaque

Una vez seleccionados los soportes compatibles con el principio activo, se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de aire dentro del empaque y el efecto de la leche descremada y el glicerol (coadyuvantes), utilizados comúnmente como estabilizadores de la viabilidad de los microorganismos durante su conservación (Burges, 1998). Los soportes seleccionados se mezclaron con los coadyuvantes al 5% y se inocularon con el cultivo bacteriano ajustándolo a la humedad seleccionada. Los soportes inoculados sin adición de coadyuvantes se utilizaron como control. Las muestras se almacenaron bajo condiciones atmosféricas diferentes: al vacío y con presencia de oxígeno y a temperaturas de  $8 \pm 2$  °C,  $18 \pm 2$  °C y  $28 \pm 2$  °C. El efecto de estas condiciones climáticas fue evaluado durante seis meses. Para los tratamientos almacenados con oxígeno se dispensaron muestras de 1g del soporte inoculado con el principio activo en viales de vidrio previamente esterilizados, los cuales se sellaron con tapones de caucho y agrafes metálicos. Para el almacenamiento al vacío se depositaron muestras de 1g del soporte inoculado con el principio activo en bolsas PET (Tereftalato de Polietileno) y se sellaron al vacío con una Selladora Van der stahl®. La viabilidad de la bacteria se determinó mediante recuento en placa sembrando en superficie tres diluciones decimales por triplicado en cajas de Petri con medio agar LB.

Se siguió un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo, y en cada tiempo de evaluación se determinó la viabilidad de dos muestras de cada tratamiento por triplicado.

### Análisis estadísticos

Se determinó la normalidad y homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Shapiro Wilks (95%) y Bartlett (95%), respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se aplicó a un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%). Se utilizó el programa Statistix versión 8.1 (Analytical Software, Florida, USA).

### Resultados y discusión

#### Producción y caracterización del principio activo *P. fluorescens* Ps006

Para los tres lotes de principio activo se obtuvo un pH promedio de 8,63, con un coeficiente de variación de 0,2%. Las concentraciones celulares para cada uno de los lotes evaluados fueron  $6.73 \times 10^9$ ,  $8.07 \times 10^9$  y  $8.93 \times 10^9$  UFC/mL. El coeficiente de variación de los resultados de evaluación fue del 0.6%, y no se evidenciaron diferencias significativas entre los resultados de los lotes ( $F=2,06$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,2081$ ), lo que indica baja variabilidad y alta repetibilidad en la producción del

principio activo (Villamizar *et al.*, 2005). En cuanto al pH, éste osciló entre 8,60 y 8,65 encontrándose que no hay diferencias significativas entre los resultados de los lotes evaluados ( $F=3,74$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,0882$ ).

Basado en los resultados obtenidos para cada parámetro, en este estudio se propusieron rangos o límites de aceptación para las características del principio activo a base de Ps006, los cuales serán utilizados como referencia para su control de calidad (tabla 1).

**Tabla 1.** Límites de aceptación establecidos para las características del principio activo.

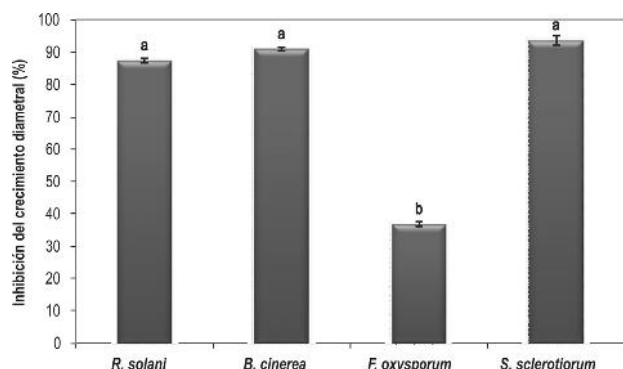
Características	Valor experimental promedio	Límites
Concentración (UFC/mL)	7,9 X10 <sup>9</sup>	> 1,0 X10 <sup>9</sup>
pH	8,63	8 - 9

En la figura 1 se observa el efecto *in vitro* del principio activo sobre los cuatro patógenos evaluados, con inhibiciones del crecimiento diametral de *R. solani* Rh200, *B. cinerea* Bc008, *S. sclerotiorum* Sc021 y *F. oxysporum* MAP5 de entre el 93,64% y 36,80%. La actividad antagonística de *P. fluorescens* ante patógenos que afectan a cultivos de importancia económica ha sido demostrada por varios autores. Por ejemplo, para *F. oxysporum* se obtuvo un control del 81,21% en condiciones de campo (Manikandan *et al.*, 2010), para *R. solani* se observaron disminuciones de la intensidad de la enfermedad del 42% (Rabindran & Vidhyasekaran, 1996) y del 47,89% (Commare *et al.*, 2002) en condiciones de invernadero. Asimismo, se obtuvo una disminución del crecimiento *in vitro* del 67,7% para *Botrytis* sp. (Mikani *et al.*, 2008) y una reducción de la incidencia de la enfermedad del 26,3% para *S. sclerotiorum* en condiciones de campo (Fernando *et al.*, 2007). Estos resultados confirman el potencial que tiene *P. fluorescens* como agente de control biológico y demuestran las potencialidades de uso de su principio activo como bioplaguicidas para el control de plagas que afectan a cultivos de importancia económica. Sin embargo, investigaciones a escala de macetas y campo son necesarias para demostrar esta hipótesis.

El patógeno más resistente a la actividad antagonística de *P. fluorescens* Ps006 fue *F. oxysporum* MAP5 con una inhibición del crecimiento diametral de tan solo el 36,80%, valor significativamente menor ( $F=14,9$ ;  $gl=3$ ;  $p=0,0000$ ) a los obtenidos con los otros patógenos evaluados, que presentaron porcentajes de inhibición superiores al 87%. Esto podría deberse a una mayor resistencia en la pared celular del micelio de *F. oxysporum*, microorganismo que posee polímeros de hetero-glucuranos que no se encuentran en los demás patógenos evaluados y que han sido relacionados con

la resistencia y el mantenimiento de la integridad celular (Nuero, 1995). Además es posible que el aislamiento de *F. oxysporum* MAP5 posea la capacidad para inhibir la biosíntesis del 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), un antibiótico de amplio espectro reconocido como uno de los principales mecanismos de acción en un amplio rango de aislamientos de *P. fluorescens* (Showkat *et al.*, 2012). Este comportamiento fue demostrado por Schouten *et al.* (2004), quienes evaluaron la sensibilidad de 41 aislamientos de *F. oxysporum* frente a dicho antibiótico y encontraron un 17% de aislamientos resistentes, lo que atribuyeron a la capacidad de este patógeno de producir ácido fusárico, un potente inhibidor de la biosíntesis del 2,4-DAPG.

El modo de acción de *P. fluorescens* como antagonista de fitopatógenos se ha relacionado con la competencia por espacio y nutrientes. Este fenómeno fue observado por Commare *et al.* (2002) que determinaron la actividad antagonística de formulaciones de *P. fluorescens* en talco, evidenciándose un control de *R. solani* del 47,89% en condiciones de invernadero, resultados atribuidos a la competencia por espacio. En el estudio realizado por Valencia *et al.* (2005), se concluyó que la actividad de *P. fluorescens* ZUM80 sobre *F. oxysporum* se debió a la competencia por nutrientes, privando al hongo del hierro disponible en el medio mediante la producción de sideróforos, capacidad antagonística que se vio favorecida cuando la bacteria tuvo un tiempo de pre-exposición en el medio (Valencia *et al.*, 2005). Además de estos mecanismos de competencia, en estudios realizados por Khanam, Ueno, Kihara, Honda, & Arase (2005) se encontró que el ácido salicílico que produce *P. fluorescens* inhibe la formación de estructuras de infección, tales como el tubo germinal y los apresorios en *B. cinerea*, lo que sugiere que esta bacteria también tiene la capacidad de producir otros metabolitos con actividad antagonística efectiva.

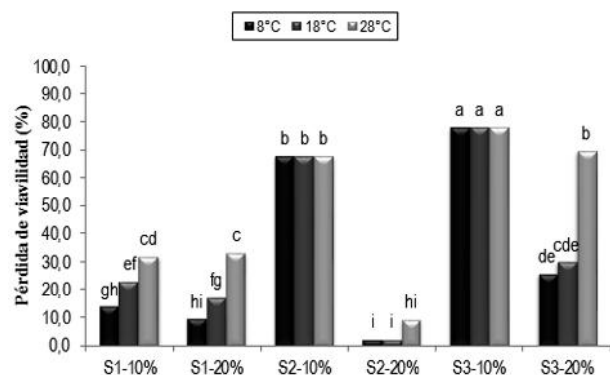


**Figura 1.** Actividad antagonística *in vitro* del principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006, determinada como la inhibición del crecimiento diametral de cuatro hongos fitopatógenos. Tratamientos con letras comunes no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

## Selección de soportes sólidos compatibles

En la figura 2 se presenta la pérdida total de viabilidad del principio activo después de tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas. Se observó para el soporte S1 al 10% de humedad (S1-10%), porcentajes de pérdida entre el 14% y el 31,9% y para S1 al 20% de humedad (S1-20%) entre el 9,6% y el 33,2%. Para el soporte S2 al 10% de humedad (S2-10%) a las tres temperaturas se obtuvo una pérdida de viabilidad del 67,7% y para S2 al 20% de humedad (S2-20%), la reducción de la viabilidad osciló entre el 2,3% y el 9,4%. Finalmente, para el soporte S3 al 10% de humedad (S3-10%) en las tres temperaturas se obtuvo una pérdida del 78,1% y para dicho soporte al 20% de humedad la pérdida de viabilidad osciló entre el 25,7% y el 69,6%.

Se evidenció que las humedades del 10% y del 20% a las cuales se ajustaron los sistemas para su almacenamiento, tuvieron un efecto en la estabilidad de la viabilidad de la bacteria Ps006, siendo la pérdida de viabilidad con los soportes S2 y S3 al 10%, significativamente mayor que para los sistemas con el 20% de humedad ( $F=402$ ;  $gl=17$ ;  $p=0,0000$ ) (Fig. 2). Esto puede deberse a que los tratamientos con el 20% de humedad requirieron la adición de un volumen de solución tampón pH 7,5 para el ajuste de la humedad, el cual posiblemente ejerció un control en el estado iónico de la formulación, haciéndola menos susceptible a cambios bruscos de pH que pueden afectar la estabilidad e integridad de la membrana citoplasmática, causar la denaturalización de enzimas y alterar las interacciones iónicas que les permiten reconocer y unirse al sustrato (Calvo et al., 2004; Nelson & Cox, 2005).



**Figura 2.** Pérdida total de viabilidad del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 mezclado con los soportes sólidos, después de tres meses de almacenamiento a tres temperaturas. S1-10%: Soporte 1 al 10% de humedad, S1-20%: Soporte 1 al 20% de humedad, S2-10%: Soporte 2 al 10% de humedad, S2-20%: Soporte 2 al 20% de humedad, S3-10%: Soporte 3 al 10% de humedad, S3-20%: Soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Las mayores pérdidas de viabilidad obtenidas con los soportes S2 y S3 cuando la humedad se ajustó al 10%, podrían deberse a que con dicha humedad la concentración de solutos en el sistema es mayor en relación con el tratamiento al 20% de humedad. Esta atmósfera hipertónica en el medio al 10% de humedad pudo ocasionar fenómenos de plasmólisis obligando a la célula a perder agua, lo que aumenta la viscosidad del ambiente intracelular disminuyendo su volumen, llevando a una retracción de la membrana citoplasmática y posteriormente a la muerte celular (Rodríguez et al., 2005; Tortora et al., 2007).

Con el soporte S1 a las dos humedades y con los soportes S2 y S3 al 20% de humedad se observó que la pérdida de la viabilidad aumentó a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento, efecto negativo que ha sido evidenciado por diferentes autores para diversos microorganismos (Chen et al., 2008; Costa et al., 2008; Guijarro et al., 2007; Santos et al., 2012). Este efecto podría deberse a que a mayor temperatura el metabolismo celular se mantiene activo, lo que causa que se almacenen metabolitos tóxicos que reducen drásticamente la viabilidad (Santos et al., 2012; Costa et al., 2002). Por ejemplo Kinay & Yildiz, (2008), evaluaron formulaciones de *Pichia guilliermondii* y observaron que las almacenadas a 4 °C fueron más estables que las almacenadas a 24 °C. Resultados similares a los del presente estudio fueron obtenidos por Santos et al. (2012) que evaluaron la estabilidad de la germinación de los conidios de los aislamientos colombianos *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034 formulados como polvos secos para espolvoreo y granulados dispersables almacenados a temperaturas de 8, 18 y 28 °C. Dichos autores obtuvieron mayores vidas útiles cuando el almacenamiento fue a 8 y 18°C, concluyendo que las temperaturas más bajas redujeron la actividad metabólica de los conidios, evitando la producción de metabolitos tóxicos y el agotamiento de nutrientes, aspectos relacionados con la fisiología microbiana.

El principio activo mezclado con los soportes S1 y S2 al 20% de humedad se seleccionaron como los sistemas de entrega base para el desarrollo de un bioplaguicida, ya que fueron los sistemas más compatibles con el principio activo de *P. fluorescens* Ps006, manteniendo estable su viabilidad y actividad biocontroladora durante tres meses de almacenamiento a  $8 \pm 2$  °C,  $18 \pm 2$  °C y  $28 \pm 2$  °C.

## Evaluación de coadyuvantes y atmósfera de empaque

Una vez seleccionados los soportes más compatibles con el principio activo se procedió a evaluar el efecto de la presencia y ausencia de oxígeno en el empaque y de dos coadyuvantes protectores de la membrana celular (leche descremada y glicerol), sobre la viabilidad de *P. fluorescens* Ps006 bajo condiciones de al-



macenamiento. Los resultados de dichos ensayos se presentan en la figura 3.

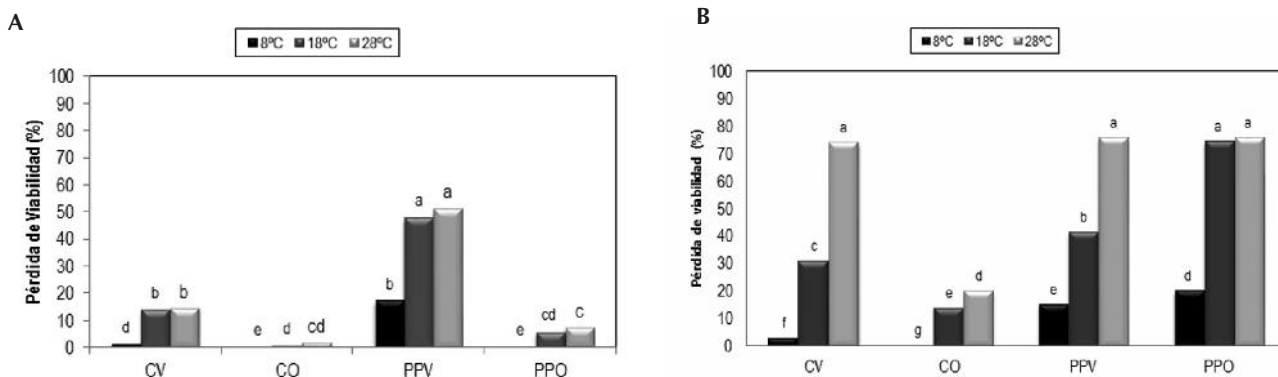
Teniendo en cuenta la concentración de la suspensión celular utilizada como principio activo ( $1 \times 10^9$  UFC/mL) y la proporción de mezcla con los soportes, la concentración teórica de la mezcla se estimó en  $1,3 \times 10^8$  UFC/mL. Los datos experimentales mostraron que la viabilidad inicial del principio activo con el soporte S1 al 20% de humedad fue de  $4,67 \times 10^7$  UFC/g y cuando fue mezclado con los protectores de membrana fue de  $1,45 \times 10^8$  UFC/g. Esta disminución en la concentración celular cuando no se utilizó protector de membrana posiblemente se relaciona con un efecto tóxico ejercido por el soporte al entrar en contacto con las células de *P. fluorescens* Ps006, que redujo su viabilidad. Sin embargo, este efecto deletéreo se vio disminuido por los protectores de membrana.

Se observó que la pérdida de viabilidad después de seis meses de almacenamiento fue directamente proporcional a la temperatura, tendencia que se evidenció para las dos condiciones atmosféricas (con y sin  $O_2$ ). El tratamiento sin protector de membrana y almacenado con oxígeno fue el más estable para el soporte S1, ya que la pérdida de viabilidad máxima fue del 20% a 28 °C en comparación con los demás tratamientos con pérdidas significativamente mayores ( $F=1622,39$ ;  $gl=10$ ;  $p=0,0000$ ), las cuales superaron el 70% bajo la misma condición de temperatura.

Para el soporte S2 se obtuvieron viabilidades iniciales de  $1,79 \times 10^7$  UFC/g cuando no se utilizaron protectores de membrana y de  $6,90 \times 10^7$  UFC/g cuando éste fue adicionado, evidenciándose nuevamente un efecto tóxico inicial al contacto con el soporte sólido. Pasados seis meses, en general se observó que la pérdida de viabilidad aumentó a medida que se incrementó la temperatura de almacenamiento. Dicha pérdida fue significativamente menor ( $F=233$ ;  $gl=9$ ;  $p=0,0000$ ) para los tratamientos almacenados con oxígeno en

comparación con los tratamientos almacenados al vacío, es decir que la ausencia de oxígeno en el empaque no mejoró la estabilidad de las formulaciones. Este comportamiento podría deberse al estrés causado por la atmósfera al vacío, sobre una bacteria aerobia obligada como *P. fluorescens*, que genera energía por un proceso de fosforilación oxidativa cuyo último aceptor de electrones es el oxígeno (Adams & Moss, 2008; Vásquez et al., 2009). El efecto negativo de la atmósfera de empaque al vacío sobre la viabilidad de *Pseudomonas* spp. evidenciado en el presente estudio, ha sido ampliamente estudiado en la industria alimenticia, donde el empaque al vacío es utilizado para inhibir el desarrollo de bacterias contaminantes (ICMSF, 2006). Evitar la implementación de sistemas de vacío es una ventaja evidente para la producción a nivel industrial, ya que se disminuyen los tiempos y costos en el proceso, aumentando así la rentabilidad del producto final.

En la mayoría de los casos la viabilidad fue significativamente mayor ( $F=233$ ;  $gl=9$ ;  $p=0,0000$ ) para los tratamientos en los cuales se mezcló el principio activo únicamente con el soporte, en comparación con los tratamientos en los que además del soporte, el principio activo se mezcló con los potenciales protectores de membrana; a excepción del tratamiento S2-20% almacenado con oxígeno, el cual no evidenció diferencias significativas cuando se usaron o no los protectores. En este sentido, el glicerol es ampliamente usado como humectante y protector osmótico (Freitas et al., 2009; Rowe et al., 2009), así como crioprotectante y protector de secado al igual que la leche descremada (Cody et al., 2008; Morgan et al., 2006; Barbaree et al., 1982). Sin embargo, se ha encontrado que ciertas cepas de *Pseudomonas* spp. utilizan el glicerol como fuente de carbono para la producción de biosurfactantes (Freitas et al., 2009; Freitas et al., 2010; Silva et al., 2010; Stanghellini, & Miller, 1997), razón por la que se podría sugerir un posible consumo del glicerol y de la leche descremada durante el almace-



**Figura 3.** Pérdida de viabilidad del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 con los soportes **A)** S1-20% y **B)** S2-20% después de seis meses de almacenamiento. CV: almacenado al vacío, CO: almacenado con oxígeno, PPV: con protectores de membrana almacenado al vacío, PPO: con protectores de membrana almacenado con oxígeno. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).



namiento de los prototipos de formulación evaluados en el presente estudio, lo que pudo haber favorecido el crecimiento del microorganismo, el mantenimiento del metabolismo celular y la producción de metabolitos tóxicos, ocasionando pérdidas de viabilidad (Santos *et al.*, 2012).

El desarrollo de formulación en polvo de bacterias antagonistas es especialmente importante para el tratamiento de semillas (Ramamoorthy *et al.*, 2001). En el presente trabajo se desarrolló un prototipo de formulación a base de la bacteria *P. fluorescens* Ps006, la cual sobrevivió durante seis meses de almacenamiento a 28°C con una mínima pérdida de viabilidad, cuando se formuló en el soporte S1 que corresponde a un arcilla ajustada a una humedad del 20% y se utilizó una atmósfera de empaque no controlada en presencia de aire. En otros trabajos se han desarrollado prototipos de formulación similares pero con menor estabilidad y en la mayoría de los casos requiriendo condiciones de refrigeración. Tal es el caso de poblaciones de *P. fluorescens* formuladas en talco con un 20% de las goma Xantan que mantuvieron su viabilidad durante 2 meses de almacenamiento a 4°C (Kloepper & Schroth, 1981). Otra formulación que al igual que el presente trabajo utilizó como soporte una arcilla tipo vermiculita, obtuvo una viabilidad estable durante 6 meses a 4°C (Connick, 1988) y en otro trabajo donde el soporte fue talco, se mantuvo la viabilidad por un período de 90 días a 26°C (Sadi & Masoud, 2012).

## Conclusiones

El prototipo de formulación en polvo mojabable (WP) a base del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 que demostró su actividad antagonista de los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Rhizotocnia solani*, *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, fue estable durante seis meses de almacenamiento en las tres temperaturas evaluadas, cuando se utilizó como soporte una arcilla ajustada a una humedad del 20%, sin adición de protectores de membrana y empleando una atmósfera de empaque con oxígeno. Las pérdidas de viabilidad fueron inferiores al 5 % durante el tiempo de almacenamiento sin refrigeración, por lo que este prototipo fue seleccionado para continuar con el desarrollo de un producto comercial con potencial para el control de enfermedades en diferentes cultivos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia el apoyo financiero a este trabajo.

## Referencias

- Adams, M., & Moss, M. (2008). *Food Microbiology. Third Edition*, Reino Unido: Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Anand, T., Chandrasekaran, A., Kuttalam, S., Senthilraja, G., & Samiyappan, R. (2010). Integrated control of fruit rot and powdery mildew of chilli using the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* and a chemical fungicide. *Biological Control*, 52(1): 1–7.
- Anjaiah, V. (2006). Biological control mechanisms of fluorescent *Pseudomonas* species involved in control of root diseases of vegetables/ fruits. En: Mukerji, K. (Ed). (2004). *Disease management of fruits and vegetables. Vol 1. Fruit and Vegetable Diseases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Barbaree, J., Thompson, F., & Smith, S. (1982). Use of thermal stability studies to compare *Bacteroides fragilis* lyophilized in skim milk and polyvinylpyrrolidone solutions. *Cryobiology*, 19, 92–98.
- Burges, HD. (Ed). (1998). *Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment*. Gran Bretaña: Kluwer Academic Publishers.
- Calvo, P., Meneses, L., & Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 7(1, 2), 141-148
- Chen, A., Zhangyan, S., & Zhang, L. (2008). The effects of some storage conditions on viability of *Lecanicillium lecanii* conidia to whitefly (Homoptera: Trialeurodes vaporariorum). *Biocontrol Science Technology*, 18(3), 267–278.
- Cody, W., Wilson, J., Hendrixson, D., McIver, K., Hagman, K., Ott, C., Nickerson, C., & Schurr, M. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed –80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135–138.
- Commare, R., Nandakumar, R., Kandan, A., Suresh, S., Bharathi, M., Raguchander, T., & Samiyappan R. (2002). *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection*, 21(8), 671–677.
- Connick, W. (1988). Formulation of living biological control agents with alginate. En Cross, B., Scher, H. (Ed). (1988). *Pesticide formulations: Innovations and developments*. ACS-Symposium Series 371, American chemical society, 241–250.
- Copping, L. (Ed). (2009). *The manual of biocontrol agents: A world compendium*. 4 ed. Reino Unido: British crop protection council publications.
- Costa, J., Teixido, U., Torres, R., & Viñas, I. (2002). Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 873–8.
- Erdogan, O., & Benlioglu, K. (2010). Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 53(1), 39–45.
- Fernando, W., Nakkeeran, S., Zhang, Y., & Savchuk, S. (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26(2), 100–107.
- Freitas, F., Alves, V., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L.,... Reis, M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Biore-source Technology*, 100(2), 859–865.
- Freitas, F., Alves, V., Pais, J., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., & Reis, A. (2010). Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. *Process Biochemistry*, 45(3), 297–305.
- Guijarro, B., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2007). Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 117–124.
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Acebo-Guerrero, Y., Velázquez-del Valle, M.G., & Hernández-Lauzardo, A.N. (2008). Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied soil ecology*, 39, 180 – 186.
- Hernández-Rodríguez, A., Rives-Rodríguez, N., Acebo-Guerrero, Y., Díaz-de la Osa, A., Heydrich-Pérez, M., & Divan-Baldani, VL.

- (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Piricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 1-10. (2006). *Microorganisms in foods 6: Microbial ecology of food commodities. Second Edition*. New York: Springer Science & Business Media.
- Kamal, A., Abo-elyousr, K., & El-hendawy, H. (2008). Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop Protection*, 27(7), 1118-1124.
- Khanam, N., Ueno, M., Kihara, J., Honda, Y., & Arase, S. (2005). Suppression of red light-induced resistance in broad beans to *Botrytis cinerea* by salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(1-2), 20-29.
- Kinay, P., & Yildiz, M. (2008). The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*, 45(3), 433-440.
- Kloepper, J., & Schroth, M. (1981). Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*, 71, 590-592.
- Loper, J., & Gross, H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 265-278.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker J. (2004). *Brock Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid, España: Prentice Hall.
- Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium wilt* of tomato. *Biological control*, 54(2), 83-89.
- Mikani, A., Etebarian, H., Sholberg, P., O'gorman, D., Stokes, S., & Alizadeh, A. (2008). Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 107-112.
- Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193.
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry. Fourth edition*. New York: W. H. Freeman Publishers.
- Nuero, O. (1995). *Estudio bioquímico de  $\beta$ -1,3-glucanasas de Aspergillus nidulans para el control biológico de Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici raza 2*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- O'callaghan, M., Swaminathan, J., Lottmann, J., Wright, D., & Jackson, T. (2006). Seed coating with biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *New Zealand Plant Protection*, 59, 80-85.
- Pradeep, F., Begam, M., Palaniswamy, M., & Pradeep, B. (2013). Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Applied Sciences Journal*, 22 (1), 70-77.
- Rabrindran, R., & Vidhyasekaran, P. (1996). Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheat blight. *Crop Protection*, 15(8), 715-721.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Saiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20, 1-11.
- Raut, I., Constantin, M., Vasilecu, G., Jecu, L., & Esan, T. (2012). Screening of antagonistic *Trichoderma* for biocontrol activities on phytopathogens. *Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies*, 16, 63-66.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (Ed). (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6 ed. Londres: Pharmaceutical Press.
- Sadi, M., & Masoud, A. (2012). Effect of pH on stability, sunflower growth promotion and biocontrol potential of a talc-based formulation of *Pseudomonas fluorescens* UTPF61. *Australian Journal of Crop Science*, 6(3), 463-469.
- Santos, A., García, M., Cotes, A., & Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150-156.
- Sastoque, E. (2010). *Producción, caracterización y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (Ranolípidos) a partir rizobacterias de fique (Furcraea spp.)*. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Schouten A., van den Berg G., Edel-Hermann V., Steinberg C., Gautheron N., Alabouvette C., de Vos CH., Lemanceau P., Raaijmakers JM. (2004). Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact*. 17(11): 1201-1211.
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q., & Guan, S. (2014). Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), 1094-1105.
- Showkat, S., Murtaza, I., Laila, O., & Ali, A. (2012). Biological control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. by *Pseudomonas fluorescens* isolated from wheat rhizosphere soil of Kashmir. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(4), 24-32.
- Siddiqui, I., & Shaukat, S. (2003). Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology & Biochemistry*, 35(12), 1615-1623.
- Silva, S., Farias, C., Rufino, R., Luna, J., & Sarubbo, L. (2010). Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 174-183.
- Smith, A., Beltrán-Acosta, C., & Cotes, A. (2013). Rizobacterias con actividad biocontroladora de *Olpidium virulentus*, como posible vector del virus de la macana del fique (*Furcraea* spp.). En: Smith, A., Beltrán-Acosta, C., & Cotes, A. (Ed). (2013). *Avances en el estudio del virus de la macana en el cultivo de fique (Furcraea spp.)*. Bogotá: Produmedios.
- Stanghellini, M., & Miller, R. (1997). Biosurfactants: Their identity and potencial efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Phytopathology*, 81(1), 1-12.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- T-Stanes & Company Limited. (Sin fecha). *Bio Cure-B*. Recuperado de <http://www.tstances.com/products-bio-cure-b.html>
- Valencia, E., Villegas, J., Sánchez, J., Peña, J., & Farías, R. (2005). Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 81-88.
- Vásquez, S., Suárez, M., & Montoya, O. (2009). Efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de solomo redondo (*Longissimus dorsi*) empacado al vacío. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(2), 191-200.
- Villamizar, L., Zeddám, J., Espinel, C., & Cotes, A. (2005). Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 127-132.

# Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia: una consulta a expertos

## Prospective analysis of agricultural bioinoculants in Colombia: an expert consultation

*Diana Corina Zambrano \**, *Ruth Rebeca Bonilla \*\**, *Laura Avellaneda \*\*\**,  
*Gregorio Zambrano \*\*\*\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48472

### Resumen

La productividad y sostenibilidad de la agricultura en Colombia pueden ser influidas positivamente a través del aprovechamiento de la biodiversidad para la producción de bioinsumos. Fueron analizados a mediano y largo plazo, los posibles escenarios futuros generados por las regulaciones que intervienen en el avance tecnológico de los bioinsumos, a través de la aplicación de una encuesta Delphi, con la participación de 23 expertos, teniendo en cuenta las tres dimensiones del desarrollo sostenible. Sobre la base de este estudio, se encontró que el 65% de los expertos consideran que el impacto de la innovación o el desarrollo tecnológico del uso de bioinsumos en la producción agrícola, tiene un alto impacto económico con un nivel de concordancia significativo ( $\geq 0.05$ ). Adicionalmente, el 65% seleccionó como el mejor escenario, en el cual se den condiciones que promuevan mayor desarrollo, acceso y aplicación de los bioinsumos, de tal forma que se incremente el ritmo de incorporación de la tecnología por parte de los productores. En conclusión, más allá del nivel de desarrollo tecnológico, es necesario revisar los procesos legislativos para la comercialización de los bioinsumos, fue evidente que el éxito futuro de la industria de la producción de productos biológicos dependerá de la gestión de empresas innovadoras, la eficiente comercialización de los mismos, la educación y transferencia a los productores y el progreso de la investigación.

**Palabras clave:** método Delphi, bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), agricultura ecológica, desarrollo sostenible.

### Abstract

Productivity and sustainability of agriculture in Colombia can be influenced positively through the use of biodiversity for the production of bioinoculants. They were analyzed in the medium and long term, the future scenarios generated by the regulations involved in the technological advancement of bio-products through the application of a Delphi survey, with the participation of 23 experts in bio-products, taking into account the three dimensions sustainable development. Based on this study, it was found that 65% of the experts believe that the impact of innovation and technological development of the use of bio-products in agricultural production, has a high economic impact with a significant level of agreement ( $\geq 0.05$ ). Additionally, 65% selected as the best scenario, in which conditions that promote greater development, access and application of bio-products, so that the rate of adoption of technology is increased by the producers to make. In conclusion, beyond the level of technological development is necessary to revise the legislative process for the marketing of bio-products, it was clear that the future success of the industry in the production of biological products depend on the management of innovative enterprises, efficient marketing thereof, education and transfer to producers and the progress of the investigation.

**Key words:** Delphi method, plant growth promoting bacteria (PGPB), organic farming, sustainable development.

**Recibido:** febrero 26 de 2015

**Aprobado:** septiembre 28 de 2015

\* Microbióloga Industrial, M.Sc., cPh.D., Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo -Instituto Tecnológico de Costa Rica. corina\_zambrano@yahoo.es.

\*\* Licenciada en Biología y Química, M.Sc., Ph.D., Directora Laboratorio de Suelos, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. rbonilla@corpoica.org.co.

\*\*\* M.Sc en Ciencias Biológicas - Área Microbiología, Investigadora Master, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. lavellaneda@corpoica.org.co.

\*\*\*\* Economista, estudiante Maestría en Economía. Profesional de Apoyo Planeación estratégica, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. gzambrano@corpoica.org.co



## Introducción

La biodiversidad se refiere a la variedad de formas vivas: animales, plantas y microorganismos diferentes; los genes que contienen y los ecosistemas de los cuales hacen parte. (Department of the Environment, Sport and Territories, 1999). Según Rangel (2005) Colombia, es uno de los dos países con mayor expresión de la diversidad biológica en todos los niveles en que esta condición se expresa alfa (especies), beta (comunidades vegetales o tipos de vegetación) y gama (ecosistemas). La biodiversidad de Colombia es más grande que otros países tropicales como Brasil y Costa Rica (Bueno et al., 2011).

La agrobiodiversidad es un sub-conjunto vital de la biodiversidad (FAO, 2004a) que comprende la variedad y variabilidad de animales, plantas y microorganismos que son importantes para la alimentación y la agricultura; derivada de la interacción entre el ambiente, los recursos genéticos y los sistemas de manejo, incluyendo las prácticas utilizadas por los productores (Ocampo, 2012). Se ha señalado que la gran diversidad de cultivos, sistemas de producción, microorganismos, especies de animales y razas es una medida de la importancia de la biodiversidad para la agricultura (Kumar et al., 2013), por lo tanto, Lobo (2008) menciona que la agrobiodiversidad es un bien estratégico de gran importancia para el desarrollo de los países megadiversos.

La diversidad de microorganismos es menos conocida que la de los recursos fito y zoo genéticos, sin embargo, representa un recurso genético de alta importancia en la agricultura (Lobo, 2008). La productividad agrícola y la sostenibilidad se benefician de los microorganismos en diversas formas. Por ejemplo, los biofertilizantes son inoculantes microbianos que pueden promover crecimiento de las plantas e incrementar su productividad, estos beneficios han sido reportados ampliamente con actividades como la fijación del nitrógeno atmosférico en gramíneas y cereales (Collino et al., 2015), así como, la mejora en la absorción de nutrientes (Bashan et al., 2014). Existen respuestas positivas a la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) en diferentes cultivos, tales como palma aceitera (Adiprasetyo et al., 2014), coco y plátano (Mia et al., 2007; Mía et al., 2010). Recientemente, Fahad et al., (2015a) mencionan que las PGPR son capaces de sintetizar fitohormonas que estimulan el crecimiento y la división celular, ayudando a que las plantas toleren las condiciones de estrés ambiental, este efecto ha sido reportado en girasol (Wagas et al., 2015), plantas ornamentales (Stetsenko et al., 2015) y maíz (Fahad et al., 2015b), entre otros.

También se han reportado una amplia gama de microorganismos que realizan el control biológico de insectos, plagas y malezas y de otros microorganismos asociados a los vegetales que contribuyen con factores de crecimiento o a los mecanismos de defensa de

éstos contra los ataques de insectos y enfermedades (Tilman et al., 2002), con amplia difusión y empleo de *Bacillus thuringiensis*, el cual ha sido aplicado durante más de 50 años para el control de plagas causadas por lepidópteros (Ruan et al., 2015). Según Lobo (2008) se sabe que más del 25% de las pérdidas agrícolas son causadas por plagas y que más del 90% son controlados por enemigos naturales que viven en áreas adyacentes a los cultivos; en este contexto, se estima que la sustitución de pesticidas por controladores naturales representa \$54 billones de dólares por año en Estados Unidos.

Otro de los usos de los bioinsumos se fundamenta en la interacción de las plantas con los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) los cuales representan un grupo de microorganismos edáficos que establecen simbiosis con las plantas influyendo positivamente en su crecimiento y desarrollo (Mujica et al., 2014), estos microorganismos forman un micelio extrarradical que permite una transferencia recíproca de carbono a partir del hospedante y nutrientes tomados del suelo (Leake et al., 2004) y entre las plantas unidas por la red micelial (Camargo-Ricalde et al., 2012). Según Mujica et al., (2014) la utilización de estos microorganismos resulta factible para cualquier sistema de producción agrícola debido a las funciones que realizan una vez que se asocian con las plantas, tales como, el incremento en la absorción de nutrientes y agua por medio del aumento en el volumen de suelo explorado, mayor resistencia a las toxinas, incremento de la traslocación y solubilización de elementos esenciales, protección contra patógenos radicales, el aumento de la tolerancia ante condiciones abióticas adversas (Smith y Read, 2008) y la estabilización de agregados en el suelo producto de la secreción de una glicoproteína recalcitrante, conocida como glomalina (Helgason et al., 2010).

En Colombia, la participación en los costos de producción asociados a fertilización y a control de plagas, enfermedades y malezas, difiere dependiendo de factores como: producto, zona geográfica y tamaño de la explotación (Perfetti et al., 2012). De esta manera, la participación de costos de producción asociados a fertilización representó en 2011 el 4,5% para los claveles y el 42% para cultivos de palma en el Meta. El control de malezas ascendió al 2,9% de los costos de un cultivo de café en la zona sur y un máximo de 12,4% para cultivos de palma en el Meta. El control de plagas correspondió al 0,9% de los costos de la producción de arroz en el Tolima y el 14,7% para el cultivo de palma en el Magdalena. El control de enfermedades ascendió a 1,6% de los costos de un cultivo de papa en Nariño y al 22,8% de un cultivo de palma en Santander (Sánchez et al., 2013).

Así mismo, el manejo inadecuado del suelo por el uso de insumos de síntesis química ha generado un problema global, causando agotamiento de la nutrición en el suelo y acidificación del suelo. Estos efectos adversos



han conllevado a reducciones en la productividad de los cultivos (Hungria y Vargas, 2000), complementario a que la eficiencia en el uso de productos químicos es muy baja y la mayor parte del insumo aplicado es desperdiciado, debido a que no es absorbido por las plantas (Robertson y Vitousek, 2009). Por lo tanto, existe una necesidad inmediata de reducir el uso de productos de síntesis química al complementar y optimizar la fertilización con productos biológicos. La gran diversidad de microorganismos benéficos ofrece numerosas oportunidades, según recomiendan Marimuthu *et al.* (2013) el uso de bacterias es conveniente y puede ser directamente aplicado a las semillas o al suelo.

Según Lobo (2008) el empleo sostenible de la diversidad debe vincularse a procesos biotecnológicos para hacerlo más eficiente. Una de las posibilidades es explorar las reservas microbiológicas nativas, debido a que ofrecen un potencial para desarrollar tecnologías alternativas para los pequeños agricultores, quienes demandan tecnologías accesibles que no representen un riesgo para el ecosistema y/o la salud. La producción de bioinsumos y extractos vegetales en Colombia ha desarrollado en los últimos años un nicho de mercado dentro del sector agropecuario nacional. En el 2008, se encontraban 71 empresas registradas y avaladas por el Instituto Colombiano Agropecuario –ICA (Zambrano y Riaño, 2008), según estos mismos autores el mercado de los bioinsumos en Colombia es nuevo y poco a poco ha venido ganando una mayor receptividad tanto por agentes interesados en su producción, como por aquellos que los requieren como insumo para sus cultivos.

En el 2010 Chaparro *et al.*, analizaron el panorama actual sobre el acceso a recursos genéticos y biológicos en los proyectos desarrollados por los grupos registrados ante Colciencias, encontrando que casi en su totalidad desarrollan productos que en su mayoría constituyen investigación básica (99%) y que difícilmente pueden tener una utilidad comercial (1%). Tal como fue señalado por Cabrera y López (2008), la falta de indicadores para separar la investigación básica de la investigación con posibilidades de uso comercial es un problema persistente y frecuente en los diversos regímenes de acceso a recurso genético. Las dificultades para la operación del sistema de acceso han tenido como consecuencia que parte sustancial de la investigación sobre la diversidad biológica y genética del país se desarrolle por fuera del marco jurídico (Nemogá, 2010).

Según Duarte y Velho (2008) es importante tener en cuenta que Colombia posee uno de los marcos jurídicos y legales más complejos a nivel mundial, que ha dificultado la posibilidad de avanzar en trabajos científicos tanto en alianza entre universidades o centros de investigación, así como, en alianzas entre lo científico y lo empresarial. Además, mencionan Duarte y Velho (2009) que como país biodiverso ha venido incremen-

tando las capacidades endógenas de sus grupos de investigación científica y tecnológica para adelantar procesos de bioprospección, pero estos esfuerzos no se han podido expresar de una forma plena ya que el marco legal que regula la exploración y explotación de la biodiversidad colombiana está limitando de una manera muy restrictiva el avance de alianzas y articulaciones.

El uso de escenarios para estudiar el futuro, permite hacer un acercamiento a situaciones que pueden dar lugar a cambios importantes y la creación de relaciones explícitas entre los eventos que no se pueden relacionar fácilmente (Bañuls y Turoff, 2011), es así, como el impacto a largo o mediano plazo de las regulaciones o políticas nuevas o cambiantes, utilizando acontecimientos de naturaleza binaria, pueden analizarse de manera prospectiva. Por lo tanto, el objetivo central de este trabajo fue desarrollar un análisis prospectivo de los bioinsumos de uso agrícola en Colombia a través de la metodología de consulta con expertos, teniendo en cuenta las tres dimensiones del desarrollo sostenible para la construcción del instrumento de captura de la información.

## Materiales y métodos

El estudio prospectivo se realizó utilizando el método Delphi (Listone y Turoff, 2002), con el fin de elaborar pronósticos a mediano y largo plazo, a través del uso sistemático del juicio intuitivo de un grupo de expertos para obtener un consenso de opiniones informadas.

### ***Elección de expertos***

Para identificar a los expertos se desarrolló una búsqueda en la base de datos Plataforma ScienTI de Colciencias, esta base de datos tenía un total de 4189 personas reconocidas por Colciencias como pares. Se realizó un primer filtro por área del conocimiento “Ciencias Agrarias”, área “Agronomía”, encontrando un total de 180 personas registradas; seguidamente se realizó un segundo filtro por área del conocimiento “Ciencias Biológicas”, área “Microbiología”, encontrando un total de 310 personas. Sus curriculum vitae fueron revisados confirmando que tuvieran trabajos desarrollados en el tema de bioinsumos, obteniendo una base de 90 expertos potenciales.

Al grupo de 90 expertos fue enviada la autoevaluación de sus competencias utilizando el Software Survey-Monkey® (<http://www.surveymonkey.com>). La competencia de los potenciales expertos se determinó a través del coeficiente de competencia, el cual debía ser superior a 0.80 para ser tenido en cuenta como experto. La competencia se determina por un coeficiente  $K = \frac{1}{2} (K_c + K_a)$ , donde  $K_c$  representa una medida del nivel de conocimientos sobre el tema investigado y  $K_a$  una medida de las fuentes de argumentación (Cruz y Martínez, 2012). Así, si  $0.8 < K < 1.0$  el coeficiente de

competencia es alto y si  $0.7 < K < 0.8$  el coeficiente de competencia es medio.

El cálculo de Kc se realizó a partir de la autoevaluación del candidato a experto determinando el nivel de conocimientos que consideraba poseer en una escala del 0 al 10, el valor seleccionado por el candidato se dividió por 10 para normalizar los datos. El promedio de las respuestas se multiplicó por 0.1; de esta forma, la evaluación "0" indica que el experto no tiene ningún conocimiento, mientras que la evaluación 10 significa que el experto tiene pleno conocimiento de la problemática tratada.

La autoevaluación de los conocimientos de los expertos de la variable Kc se realizó calificando los siguientes criterios: a) Mejora de la producción, control de calidad y procesos agroindustriales, nuevos bioinsumos y biotecnologías para el medio ambiente. b) Percepción pública de la biotecnología, bioseguridad, aspectos legales, sociales y económicos de la biotecnología. c) Innovación y desarrollo biotecnológico y d) Políticas públicas en bioinsumos.

El cálculo de la variable Ka se realizó a partir de la autoevaluación de los posibles expertos, de acuerdo a seis posibles fuentes de argumentación en una escala tipo Likert expuestas en la tabla 1 (Cruz y Martínez, 2012). Cada uno tuvo que seleccionar según su criterio si era alto, medio o bajo y a cada criterio se le asignó un valor. En el instrumento de captura de la información en el momento de la respuesta. no fueron visibles los valores.

### Elaboración y lanzamiento de los cuestionarios

El cuestionario de consulta a los expertos se compuso por 30 preguntas agrupadas en 3 módulos. Luego de diseñadas las preguntas por los autores el formulario fue validado con 3 especialistas externos antes de ser enviados a los expertos. Fue desarrollado teniendo en

cuenta las tres dimensiones del desarrollo sostenible involucrando consideraciones ambientales, económicas y sociales (Hodson y Díaz, 2013). En la tabla 2 se resumen estos criterios.

Sobre la base de las dimensiones anteriores se diseñó un instrumento en el cual se desglosaron en un total de 26 preguntas, para que fueran valorados en bajo, alto y medio.

En la construcción de escenarios en la escala se les planteó la opción de elección de alguno de los dos escenarios: 1) La tendencia y el ritmo actual de incorporación de bioinsumos en la producción agrícola se mantiene como hasta el momento; y 2) Se dan condiciones que habilitan a un mayor desarrollo, acceso y aplicación de los bioinsumos, de forma tal que se incrementa el ritmo de incorporación a los sistemas de producción agrícola. 1= Muy improbable, 2= Improbable, 3= Existe duda, 4= Probable y 5= Muy probable, de acuerdo a la experiencia y conocimiento de los expertos.

Los expertos fueron encuestados de manera aislada y sus opiniones fueron recogidas por vía electrónica y de forma anónima utilizando el Software Survey-Monkey®, con esto se trató de eliminar el efecto de los líderes.

### Desarrollo práctico y análisis de resultados

El análisis de la información se realizó utilizando el software SPSS 21,0, para el cálculo del Coeficiente de concordancia de Kendall (W de Kendall) que representa el nivel de consenso entre los participantes (Schmidt, 1997; Schmidt et al., 2001). Este coeficiente varía entre 0 y 1, indicando el grado de consenso alcanzado por el panel (fuerte consenso para  $W > 0,7$ , consenso moderado para  $W = 0,5$  y débil consenso para  $W < 0,3$ ) (Schmidt et al., 2001).

**Tabla 1.** Escala tipo Likert para el cálculo de Ka en el instrumento.

Fuentes de argumentación	Grados de influencia de las fuentes en sus criterios		
	Alto	Medio	Bajo
Investigaciones realizadas por usted	0.30	0.20	0.10
Su experiencia laboral adquirida	0.50	0.40	0.20
Trabajos de autores nacionales que conoce y han trabajado la temática	0.05	0.05	0.05
Trabajos de autores extranjeros	0.05	0.05	0.05
Su conocimiento del estado del problema a través de intercambios de conocimientos	0.05	0.05	0.05
Participación en grupos diseñadores de programas, materiales e iniciativas.	0.05	0.05	0.05

**Tabla 2.** Componentes y variables del instrumento Delphi.

Componente	Dimensión	Categoría
Importancia para la sociedad, la economía y el medio ambiente	Económica	Disminución de costos de la producción agrícola
	Económica y social	Competitividad de los pequeños y medianos productores
	Económica	Amenazas y oportunidades para Colombia
	Económica	Estrategias de aprovechamiento
	Económica, social y ambiental	Potencial de aplicación, desarrollo industrial, calidad de vida, medio ambiente y empleo.
Multidisciplinarietà para el desarrollo de bioinsumos	Social	Capacidad actual del recurso humano
	Económica y social	Capacidad en el país a nivel científico, tecnológico, innovación. Producción y comercialización.
Percepción del desarrollo potencial de los bioinsumos por medio de la propiedad intelectual	Social	Consenso a nivel internacional en cuanto a los requerimientos regulatorios
	Económica, ambiental	Favorecimiento del comercio internacional, nuevos desarrollos, incremento en las capacidades productivas.
	Económica	Propiedad intelectual para el uso de bioinsumos y sus impactos.

Schmidt (1997) propuso dos criterios estadísticos para tomar decisiones sobre cómo suspender o continuar las rondas Delphi. El primer criterio es un fuerte consenso entre los miembros del panel que se determina con base en el coeficiente de concordancia de Kendall. Si hay un acuerdo tal, el proceso de la encuesta debe ser detenido (Habibi *et al.*, 2014); por lo tanto, solo se realizó una sola ronda en este estudio.

## Resultados y discusión

### Elección de expertos

La autoevaluación de expertos fue enviada a 90 personas y respondida por 25 personas, de los cuales 23 fueron clasificados como expertos de acuerdo a los coeficientes K superiores a 0.7. En la tabla 3 se presenta el cálculo de la competencia de cada participante, donde se pudo identificar que el 56% de los expertos tenían competencia alta, el 36% de los expertos poseían competencia media y el 8% poseía competencia baja. Las respuestas de los expertos con nivel de competencia bajo no fueron tenidas en cuenta en el análisis.

### Elaboración y lanzamiento de los cuestionarios

La encuesta fue respondida en su totalidad por los 23 expertos que se encontraban en rango medio y alto

en el valor de K. El cálculo del coeficiente de Kendall reveló un consenso moderado  $W = 0,45$ , lo cual es comprensible al observar que el número de expertos es casi la mitad del número de ítems. No obstante, el resultado fue significativo ( $X^2 = 65,22$ ;  $p \geq 0,05$ ).

### Importancia para la sociedad, la economía y el medio ambiente

Los expertos consideraron que los bioinsumos son importantes para disminuir los costos de la producción agrícola, tal como fue mencionado por Herridge *et al.* (2008) quienes estimaron en Vietnam que el costo anual de la fertilización nitrogenada se reduciría de USD \$30 a USD \$1 millón por año si los fertilizantes químicos fueran reemplazados por inoculantes.

Según Shankar *et al.* (2011) la baja eficiencia de la producción agrícola está estrechamente relacionado con la pobre conversión energética que, a su vez, está influida por los factores fisiológicos del cultivo, el medio ambiente y otros factores biológicos, incluyendo los microorganismos del suelo. El suelo y la microflora rizosférica pueden acelerar el crecimiento de las plantas y mejorar su resistencia a patógenos e insectos mediante la producción de metabolitos bioactivos. Los expertos consideran altamente probable que los bioinsumos mejoren la competitividad de los pequeños y medianos productores agrícolas.

**Tabla 3.** Resultados nivel de competencia de los participantes.

Encues- tado	Kc	Ka	K	Nivel de competencia
1	0,8	0,9	0,9	Alto
2	0,5	0,5	0,5	Bajo
3	0,8	0,8	0,8	Alto
4	0,7	0,9	0,8	Alto
5	0,4	1,0	0,7	Medio
6	0,5	1,0	0,7	Medio
7	0,7	0,9	0,8	Alto
8	0,6	0,8	0,7	Medio
9	0,8	0,9	0,8	Alto
10	0,7	1,0	0,8	Alto
11	0,6	1,0	0,8	Alto
12	0,6	0,9	0,8	Alto
13	0,6	0,9	0,7	Medio
14	0,5	0,9	0,7	Medio
15	0,6	0,8	0,7	Medio
16	0,5	1,0	0,7	Medio
17	0,9	1,0	0,9	Alto
18	0,7	0,8	0,7	Medio
19	0,7	1,0	0,9	Alto
20	0,4	0,8	0,6	Bajo
21	0,6	0,8	0,7	Medio
22	0,9	1,0	1,0	Alto
23	0,7	0,9	0,8	Alto
24	0,6	1,0	0,8	Alto
25	0,8	1,0	0,9	Alto

La opinión de los expertos con un nivel de concordancia significativa ( $\geq 0,05$ ) en los criterios calificados sobre el impacto de la innovación o el desarrollo tecnológico del uso de bioinsumos en la producción agrícola, muestra que el 65% considera que tiene un potencial alto, el 31% medio y un 4% bajo en el impacto económico. El potencial alto de impactar la producción agrícola ha sido mencionado por Herrmann y Lesueur (2013), quienes resaltan que especialmente los biofertilizantes pueden tener importancia económica debido a que reemplazan parcialmente a los fertilizantes de síntesis química, los cuales son cada vez más costosos. Además, otros autores como Shankar *et al.* (2011) mencionaron que existe un creciente consenso

a nivel mundial, acerca de la factibilidad de obtener el máximo rendimiento agronómico con utilidades netas más altas sin el uso de fertilizantes artificiales, herbicidas, insecticidas y pesticidas.

Montoya (2010) mencionó que la biotecnología y las ciencias de la vida son las más prometedoras para abordar problemas complejos, por su capacidad de desarrollar productos para varios sectores de la economía de manera sostenible y eco-innovadora. El 52% de los expertos consideran que el potencial de desarrollo de bioinsumos a nivel industrial es alto, el 39% medio y el 9% bajo; la percepción podría explicarse por las dificultades que deben superar las pequeñas y medianas empresas de biotecnología, por tener un alto coeficiente de capital y largos tiempos para la rentabilidad; basados en lo reportado por Montoya (2010).

Los expertos consideran que los insumos podrían convertirse en una herramienta útil para incrementar la competitividad de la agroindustria, el 78% considera que es alto, el 18% medio y 4% bajo, esto ha sido ampliamente soportado por autores que mencionan que las PGPRs en cultivos de leguminosas que fijan el nitrógeno tales como maní, frijol y soja pueden generar el ahorro entre 20 – 40% de nitrógeno químico, logrando la fijación de 50-300 kg de nitrógeno al suelo y disminuyendo aproximadamente entre 55 a 220 kg de urea por hectárea (Gomare *et al.*, 2013). Sin embargo, pese a los beneficios reportados, estudios recientes muestran que hay una actividad inventiva muy baja y escaso impacto industrial en los desarrollos relacionados con cultivos relevantes para el Colombia, tales como la caña de azúcar y el café (Silva *et al.*, 2014).

El 70% de los expertos considera que el impacto en la calidad de vida de los productores es alto, el 22% medio y el 8% bajo. Se observó que este mejoramiento posiblemente pudo ser visto como la disminución de los costos de producción, que generan, al mismo tiempo el incremento en los ingresos percibidos por el productor, esto es coincidente con lo reportado por Khalid (2012) quien menciona que el uso de bioinsumos es más económico que el de insumos de síntesis química, por lo tanto, mejoran los ingresos de los agricultores y su uso es más seguro para la salud de ellos y de los consumidores (Khalid 2004).

El uso de fertilizantes inorgánicos, en particular nitrógeno y fósforo, ha sido relacionado con la eutrofización de los cuerpos de agua, además, la evidencia es fuerte con respecto a la disminución de la biodiversidad en los sistemas agrícolas y sistemas semi-naturales y naturales por el uso de abonos inorgánicos, herbicidas y pesticidas en la agricultura. Existen varios reportes sobre la resistencia adquirida a productos químicos, utilizados para control de malezas y plagas (Andrews *et al.*, 2010). Este contexto está de acuerdo con la opinión de los expertos quienes manifestaron que la incorporación de bioinsumos tiene sobre el medio ambiente un impacto alto el 79%, medio el 17%



y bajo el 4%, debido a la amplia contribución de los microorganismos del suelo a la sostenibilidad de los ecosistemas, actuando como los agentes principales de conducción del ciclo de nutrientes, la regulación y dinámica de la materia orgánica del suelo, la inmovilización de carbono en el suelo y la emisión de gases efecto invernadero. Debido a los efectos de los microorganismos en el suelo se logra modificar su estructura física y regímenes de agua, la mejora de la eficiencia de la absorción de nutrientes y la salud de las plantas (Shankar et al., 2011).

Los expertos consideran que en el empleo el uso de bioinsumos tiene un impacto del 48% alto, 43% medio y 8% bajo. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Montoya (2010) en la empresa Biocultivos S.A, empresa de base tecnológica integrada por la Universidad Nacional de Colombia y el gremio de cultivadores de arroz, se crearon 24 puestos de trabajo altamente calificados y 15 técnicos.

### ***Multidisciplinariedad para el desarrollo de bioinsumos***

A los expertos se les solicitó la valoración de si la capacidad actual de los profesionales colombianos es suficiente para el desarrollo de bioinsumos a nivel comercial, frente a esta pregunta respondieron el 35% que existe duda, 30% es probable y 35% muy probable; aunque no hubo un consenso entre los participantes, si se observó una tendencia a considerar que es apropiada la capacidad de los profesionales debido a que ninguno marcó las opciones de muy improbable e improbable que eran las calificaciones más bajas. Esto coincide con los resultados presentados por Duarte y Velho (2009), quienes mencionaron que los grupos dedicados a realizar bioprospección poseen recursos humanos capacitados para realizar investigación en áreas de conocimiento que son básicas para llevar a cabo dicho proceso, y que este proceso de formación académica refleja el producto de una política colombiana para capacitar recursos humanos a nivel de doctorado, tanto en universidades extranjeras como a través de los programas nacionales.

Las experiencias demuestran que a medida que el país proveedor de los recursos naturales posea más capacidad científica y tecnológica instalada, aprovechará de una mejor forma las potencialidades del desarrollo de los bioinsumos, a través de la bioprospección (Laird y Wynberg, 2002; Quezada, 2004). Por lo tanto, fue consultada la opinión de los expertos sobre la posición de Colombia con respecto a otros países quienes respondieron con un nivel débil de acuerdo a  $W=0,119$  (no significativo  $\leq 0,05$ ), el primer criterio fue la capacidad científica y tecnológica calificada por los expertos como alta en un 35%, media 52% y baja 13%; el segundo criterio fue la capacidad de innovación valorada como alta en un 22%, media en el 56% y baja en el 22%; el tercer criterio fue la capacidad de producción,

que fue evaluada como alta por el 13%, media el 79% y baja el 17%; y por último, la capacidad de comercialización considerada en un 9% como alta, media en el 61% y baja por el 30%.

En términos generales los expertos consideraron que la capacidad científica y tecnológica se encuentra en un nivel medio; sin embargo, debe resaltarse la opinión de una baja capacidad de comercialización. Este mismo criterio fue mencionado en el 2001 por Castellanos et al., quienes plantearon la necesidad del surgimiento de un nuevo tipo de expertos, quienes además de ser especializados en ciencia y tecnología, deben lograr un entendimiento mayor del mundo de los negocios, de manera que los científicos puedan convertirse no sólo en generadores de conocimiento, sino también en interlocutores con capacidad de llegar a la industria para apoyar los procesos de selección, negociación, implantación o transferencia de tecnologías.

### ***Percepción del desarrollo potencial de los bioinsumos por medio de la propiedad intelectual***

La propiedad intelectual sobre los microorganismos, especialmente la patentabilidad, ha despertado el interés no sólo de los juristas, sino también de los científicos, debido a que las invenciones microbiológicas pueden ser de procedimiento o de producto, referidas a aquellos productos obtenidos con la intervención de microorganismos, los cuales pueden incluir materia inanimada (metabolitos) o animada (microorganismo) (Martínez, 2014). Los expertos fueron consultados sobre la probabilidad de alcanzar el consenso en los países sobre los requerimientos regulatorios, para la utilización de los bioinsumos en la producción agrícola, el 48% de los expertos estimaron que este consenso podrá ocurrir en el periodo 2020-2024.

La protección a través de mecanismos de propiedad intelectual de los bioinsumos permitirá que la producción y desarrollo, según el concepto de los expertos, aumentará mucho 52%, aumentara poco 26% y se mantendrá estable 22%. Según Gonzales et al. (2010), los derechos de propiedad intelectual tienen una gran importancia porque otorgan, además del reconocimiento a los creadores, la retribución económica que les corresponde por el desarrollo de los productos o los procesos.

El aumento de la protección de la propiedad intelectual de bioinsumos, podrá darse en Colombia según el 43% de los expertos si se revisa el sistema de propiedad intelectual, si se aumenta la capacidad de seguimiento y negociación de acuerdos comerciales según el 33% de los expertos, el 14% no sabe/no responde, por último, el 10% considera que Colombia deberá concientizar a los generadores de nuevas tecnologías de la necesidad de patentar sus innovaciones. Según Solleiro y Briceño (2003) la protección de la propiedad intelectual debe funcionar como motor de la innova-

ción y no como obstáculo para el desarrollo nacional; sin embargo, la percepción de los expertos es que ha limitado el desarrollo de productos.

Tomando como horizonte el 2020, fue consultado a los expertos si la propiedad intelectual tendrá alguna clase de impacto en la capacidad de innovación biotecnológica en Colombia, y que impacto considera más factible. Los expertos manifestaron que tendrá un aumento importante de la capacidad de innovación en bioinsumos 43%, no tendrá impacto significativo en la capacidad de innovación en bioinsumos 26%, impactará en términos de una disminución de la capacidad de innovación en bioinsumos 13%, no sabe/no responde 4% y otro 13%. El aumento percibido en la opinión de los expertos puede ser atribuido a que una protección de la propiedad intelectual bien concebida alienta la actividad creativa, el desarrollo industrial, la inversión y el comercio honesto; sin embargo algunos autores como Granados *et al.* (2009) señalan que los regímenes de propiedad intelectual más enérgicos, puedan disminuir el ritmo general de la innovación e incrementar la diferencia de conocimientos entre países industrializados y países en vías de desarrollo.

### **Construcción de escenarios**

El 35% (8/23) de los expertos seleccionó el escenario número 1, la tendencia y el ritmo actual de incorporación de bioinsumos en la producción agrícola se mantiene como hasta el momento; y el 65% (15/23) seleccionó el escenario número 2, se dan condiciones que habilitan a un mayor desarrollo, acceso y aplicación de los bioinsumos, de forma tal que se incrementa el ritmo de incorporación a los sistemas de producción agrícola.

Bajo el escenario 1 los expertos consideraron que en el 2020 será posible lograr 39 bioinsumos nuevos registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) durante el año, a esto respondieron que existe duda en un 38%, y en el escenario 2 que existe duda con el 39%. En ambos escenarios se presenta un resultado similar, los expertos mencionaron que si se implementan políticas adecuadas de generación de empresas de base biotecnológica e investigación, 39 bioinsumos registrados/año es un número sensato si se considera la dinámica del sector agrícola y los grupos de investigación en Colombia.

Fue propuesta la proyección al 2029, plateando la posibilidad que se lograrán 87 bioinsumos nuevos registrados ante el ICA durante el año, el 50% de los expertos seleccionaron en el escenario 1 que existe duda y en el escenario 2 el 35% como probable. Estos resultados muestran que para alcanzar a mediano plazo un alto número de registros de nuevos bioinsumos se deben hacer cambios; es decir, así Colombia cuente con una alta biodiversidad que ha permitido aislar muchos organismos con potencial, la legislación

colombiana tiende a afectar las iniciativas nacionales y por ende a incentivar actividades ilegales, el subregistro o incluso favorecer a empresas extranjeras. Según Nemogá (2010) básicamente ese potencial industrial que tiene la biodiversidad, no se puede aprovechar si no se cumplen requerimientos del marco jurídico institucional, incluso se pueden presentar problemas para publicar resultados de investigación o cuando se pretenden derechos de propiedad intelectual sobre tales resultados o innovaciones.

Frente a la pregunta si el sector productivo agrícola colombiano estará preparado para acompañar, absorber y aprovechar los avances científicos y tecnológicos nacionales e internacionales en bioinsumos, los expertos que seleccionaron el escenario 1 respondieron que es probable en un 50%, y en el escenario 2 respondieron que existe duda 52%. Estos resultados indican que es más fácil que el sector productivo incorpore estas tecnologías como parte de sus insumos manteniendo las condiciones actuales, posiblemente porque en el escenario 2 tendría que buscarse nuevos mercados debido al número mayor de productos. En cualquiera de los dos casos, es posible que los agricultores que adopten esta biotecnología, especialmente quienes lo hagan cuanto antes, consigan beneficios gracias a la reducción de costos y el aumento de la producción; los otros agricultores podrían verse en desventaja competitiva según evolucionen las preferencias de los consumidores y los regímenes reglamentarios (FAO, 2004b).

A los expertos se les consultó que si tuvieran en sus manos la toma de decisiones cuál sería su recomendación en cuanto a la estrategia para mejorar el estado actual del país en la producción de bioinsumos ( $W=0,337$ ;  $X^2=29,677$ ;  $\leq 0,05$ ), teniendo en cuenta criterios como la colaboración con empresas extranjeras. Los resultados muestran que los expertos consideran que existe duda 35% en que la colaboración de empresas extranjeras pueda contribuir al desarrollo de la industria de bioinsumos en el país; la tendencia de esta respuesta era predecible de acuerdo a lo reportado por Martínez (2014) que menciona que en los países en desarrollo y en los emergentes se han generado inquietudes que han llevado a estar en contra de la apropiación y patentabilidad de genes por parte de corporaciones pertenecientes a Estados industrializados.

La incorporación de científicos y técnicos en las empresas podrá contribuir al desarrollo de la industria de los bioinsumos fue calificado por los expertos como muy improbable 9%, improbable 9%, existe duda 4%, probable 17% y muy probable 61%. El resultado de muy probable, es reafirmado por un informe de la Comisión Europea que menciona que la creación de un puesto de trabajo de investigador, puede generar a largo plazo hasta 400 empleos directos o indirectos, a pesar de esta afirmación, y del consenso generalizado de que la presencia de investigadores, y en concreto

de doctores, es clave para fomentar la innovación tecnológica en las empresas, todavía para las empresas el doctor es una figura desconocida que desarrolla su actividad en el campo de la docencia y la investigación pública (Comunidad de Madrid, 2012).

Los expertos fueron consultados acerca de la contribución del Modelo de la Triple Hélice (Etzkowitz y Leydesdorff, 1995) y, si ellos recomendarían el fomento de la coordinación industria - centros de investigación y desarrollo tecnológico, su opinión fue que sería muy improbable 4%, improbable 0%, existe duda 4%, probable 13% y muy probable 78%. La respuesta de los expertos fue en un alto porcentaje muy probable; sin embargo, debe tenerse en cuenta aspectos como el que menciona Gutiérrez (2004) en un modelo en el que los actores se deben desenvolver como esferas en movimiento, cada una de las cuales puede desempeñar funciones de la otra esfera, no pueden ser estáticas y quedarse encasilladas, haciendo que el flujo de conocimiento pueda tener una dirección en un sentido inverso al tradicional, es decir, el conocimiento puede fluir de la industria privada a la academia, en un efecto interactivo en el cual la innovación tecnológica abre nuevas preguntas de investigación básica.

Los expertos consideran que ellos sugerirían el apoyo del gobierno como una recomendación en un 5% muy improbable, improbable 0%, existe duda 5%, probable 27% y muy probable 64%. Este último porcentaje muestra la relevancia y la necesidad de intervención del gobierno colombiano; en el 2011 se expidió el documento CONPES 3697 sobre políticas para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad. Este documento propone fortalecer las capacidades institucionales para el desarrollo comercial de la biotecnología, promoviendo el uso comercial, sostenible y productivo de los recursos biológicos, genéticos y sus derivados; la creación de instrumentos financieros para fortalecer empresas de base biotecnológica; adecuar y revisar el marco normativo relacionado con el acceso a los recursos genéticos y sus derivados; y ajustar y actualizar la normatividad sobre producción y comercialización de medicamentos biotecnológicos y productos fitoterapéuticos. El mismo documento CONPES reconoce las dificultades que ha tenido Colombia en la aplicación de la normatividad sobre Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados, Decisión Andina 391, esto generó la reorganización y cambio en el del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible frente a este tema (Buitrago, 2012).

La probabilidad de que los expertos recomienden la difusión de resultados según los expertos fue calificada como muy improbable 5%, improbable 5%, existe duda 0%, probable 36% y muy probable 55%. Los resultados muestran que la difusión de los resultados o su transferencia es de vital importancia, acorde con uno de los factores claves en el caso mexicano se-

gún Gutiérrez (2004), en el Sistema de Nacional de Innovación –SIN los gobiernos estatales, las empresas y la academia resultan ser los elementos fundamentales; pero no los únicos, incluyendo a las empresas, los sectores productivos en general, centros de investigación, el sistema financiero, universidades técnicas, organizaciones intermedias de apoyo a la actividad empresarial, proveedores de servicios, diseñadores de productos y consumidores. La producción y transferencia de conocimiento científico y tecnológico constituyen la materia esencial de intercambio, aprendizaje e interacción entre los actores.

## Conclusiones

La prospectiva tecnológica es una herramienta que puede generar información de gran ayuda para los tomadores de decisiones públicos y privados, permitiendo conocer con más detalle los escenarios que pueden presentarse a mediano y a largo plazo en el desarrollo de la industria biotecnológica de los bioinsumos, que permitirá definir y concretar los objetivos de manera coherente y con menores niveles de riesgo e incertidumbre, basados en el criterio de expertos.

Los expertos consideraron que el escenario más probable y favorable para Colombia es que se den condiciones que habiliten un mayor desarrollo, acceso y aplicación de los bioinsumos, de forma tal que se incremente el ritmo de incorporación a los sistemas de producción agrícola, lo que indica que los avances hacia la empresarización de la producción de bioinsumos en Colombia deben ir más allá del desarrollo tecnológico. Es necesario revisar los procesos de promoción y apoyo a las empresas nacionales de base biotecnológica que permita el desarrollo sostenible a partir del uso de la biodiversidad. Es evidente que el éxito futuro de la industria de la producción de bioinsumos dependerá de la gestión de empresas innovadoras que tengan iniciativa de vincular investigadores, la eficiente comercialización de productos, la educación y transferencia de tecnología a los productores y al público en general.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a todos los participantes que colaboraron con el estudio Delphi, tanto a los especialistas que revisaron el instrumento de captura de la información, como a los expertos que contribuyeron con su criterio.

## Referencias

- Adiprasetyo, T., Purnomo, B., Handajaningih, M., Hidayat. (2014). The Usage of BIOM3G-Biofertilizer to Improve and Support Sustainability of Land System of Independent Oil Palm Smallholders. *International Journal on Advanced Science Engineering*, 4(5), 43-46.
- Andrews, M., Hodge, S., Raven, J. (2010). Positive plant microbial interactions. *Annals of Applied Biology*, 157, 317-320.



- Bañuls, V., Turoff, M. (2011). Scenario construction via Delphi and cross-impact analysis. *Technological Forecasting & Social Change*, 78, 1579–1602.
- Bashan, Y., de Bashan, L., Prabhu, S., Hernández, J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378, 1–33.
- Bueno, J., Coy, E., Stashenko, E. (2011). Antimycobacterial natural products – an opportunity for the Colombian biodiversity. *Revista Española de Quimioterapia*, 24 (4), 175-183.
- Buitrago, G. (2012). Tres décadas de biotecnología en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 5-6.
- Cabrera, J., López, C. (2008). Enfrentando los problemas de acceso: protegiendo las fuentes, mientras que se brinda certeza a los usuarios. UICN Serie de Política y Derecho Ambiental, No. 67/1.
- Camargo-Ricalde, S., Montaña, N., De la Rosa, C., Montaña, S. (2012). Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*, 13(7), 3-19.
- Castellanos, O., Ustate, E., de Peña, M. (2001). Fundamentos para una política nacional en Biotecnología. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(2), 23-29.
- Chaparro, G., Ávila, L., Blanco, J. (2010). Panorama actual sobre acceso a recursos genéticos y biológicos. La investigación sobre recursos biológicos y genéticos en el país: Grupos registrados en Colciencias. Colombia. 31p.
- Comunidad de Madrid. (2012). Cuaderno de trabajo: la inserción laboral del doctor en la empresa. Fundación universidad-empresa Dg de universidades e investigación – Comunidad de Madrid. Disponible en Internet: [http://www.madrimasd.org/empleo/documentos/doc/Debate\\_Integracion\\_Laboral\\_Doc-tor.pdf](http://www.madrimasd.org/empleo/documentos/doc/Debate_Integracion_Laboral_Doc-tor.pdf) (Con acceso 9/01/2015).
- Collino, D., Salvaggiotti, F., Peticari, A., Piccinetti, C., Ovando, G., Uguaiaga, S., Racca, R. (2015). Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil and meteorological factors. *Plant Soil*, 392, 239–252.
- Cruz, M., Martínez, M. (2012). Perfeccionamiento de un instrumento para la selección de expertos en las investigaciones educativas REDIE. *Revista electrónica de investigación educativa*, 14(2), 167-179.
- Department of the Environment, Sport and Territories (DEST). (1998). Biodiversity and its value. Disponible en Internet: [http://kaos.erin.gov.au/life/general\\_info/op1.html](http://kaos.erin.gov.au/life/general_info/op1.html). (Con acceso 9/02/2015).
- Duarte, O., Velho, L. (2008). Análisis del marco legal en Colombia para la implementación de prácticas de Bioprospección. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 103-122.
- Duarte, O., Velho, L. (2009). Capacidades científicas y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad*, 12(4), 55-68.
- Etzkowitz, H., Leydesdorff, L. (1995). The Triple Helix University Industry Government Relations: A laboratory for Knowledge based Economic Development. *European Association for the Study of Science and Technology Review*, 14, 14-19.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Ahmed Khan, F., Khan, F., Chen, Y., Wu, C., Tabassum, M., Chun, M., Afzal, M., Jan, A., Jan, M., Huang, J. (2015a). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4907–4921.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M., Tareen, A., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N., Huang, J. (2015b). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75, 391–404.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004a). Building on Gender, Agrobiodiversity and Local Knowledge. 6p. Disponible en Internet: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5609e/y5609e00.pdf>. (Con acceso 28/10/2014).
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004b). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2003-2004. Disponible en Internet: [www.fao.org/docrep/006/y5160s/y5160s00.htm](http://www.fao.org/docrep/006/y5160s/y5160s00.htm) (Con acceso 05/02/2015).
- Gomare, K., Mese, M., Shetkar, Y. (2013). Isolation of *Rhizobium* and cost effective production of biofertilizer. *Indian Journal of Life Sciences*, 2(2), 49-53.
- Gonzales, C., Villa, J., Bravo, J. (2010). La biotecnología como visión de empresa. *Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 83-92.
- Granados, G., López, G., Hernández-García, M. (2009). Recursos genéticos, biotecnología y propiedad intelectual. *Revista Chapingo*, 15(2), 127-140.
- Gutiérrez, N. (2004). La vinculación en el ámbito científico-técnico de México. Instituciones de educación superior en interacción con distintos actores. *Revista Latinoamericana de Estudios Educativos*, 34(2), 47-94.
- Habibi, A., Sarafrazi, A., Izadayar, S. (2014). Delphi Technique Theoretical Framework in Qualitative Research. *The International Journal of Engineering and Science*, 3(4), 8-13.
- Helgason, B., Walley, F., Germida, J. (2010). No-till soil management increases microbial biomass and alters community profiles in soil aggregates. *Applied Soil Ecology*, 46, 390-397.
- Herridge, D., Peoples, M., Boddey, R. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311, 1–18.
- Herrmann, L., Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 8859–8873.
- Hodson de Jaramillo, E., Díaz-Ariza, L. (2013). Uso de bioinoculantes en la agricultura: Alternativa de manejo sostenible. En: Hodson de Jaramillo, E., Zamudio, T. Biotecnologías e Innovación: el compromiso social de la ciencia. Ed. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 327p.
- Hungria, M., Vargas, M. (2000). Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2-3), 151-164.
- Khalid, K. (2004). Response of white mustard (*Sinapis alba* L.) plants to calcium superphosphate and phosphorene under calcareous soil conditions. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), 735-747.
- Khalid, K. (2012). Review: Biological fertilization and its effect on medicinal and aromatic plants. *Nusantara Bioscience*, 4(3), 124-133.
- Kumar, T., Raj, K., Atique, K., McDonald, M. (2013). Exploring agrobiodiversity on farm: A case from middle-hills of Nepal. *Small-scale Forestry*, 12, 611–629.
- Laird, S., Wynberg, R. (2002). "Institutional policies for biodiversity research". En: Sarah A. Laird (ed.): Biodiversity and Traditional Knowledge, Equitable Partnerships in Practice, Londres, Earthscan Publications Ltd, pp. 39-76.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1016-1045.
- Listone, H., Turoff, M. (2002). The Delphi Method. Techniques and Applications. Disponible en Internet: <http://is.njit.edu/pubs/delphibook/delphibook.pdf>. (Con acceso 14/07/2015).
- Lobo, M. (2008). Importancia de los recursos genéticos de la agrobiodiversidad en el desarrollo de sistemas de producción sostenibles. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(2), 19-30.
- Marimuthu, S., Ramamoorthy, V., Samiyappan, R., Subbian, P. (2013). Intercropping system with combined application of *Azospirillum* and *Pseudomonas fluorescens* reduces root rot incidence caused by *Rhizoctonia bataticola* and increases seed cotton yield. *Journal of Phytopathology*, 161, 405– 411.
- Martínez, M. (2014). La patente biotecnológica y la OMC. Capítulo III La patentabilidad de los microorganismos y de los proce-



- dimientos no biológicos y microbiológicos. pp. 139-181. Ed. Marcial Pons. Madrid, España.
- Mia, M., Shamsuddin, Z., Zakaria, W., Marziah, M. (2007). Associative nitrogen fixation by *Azospirillum* and *Bacillus* spp. in bananas. *Infomusa*, 16, 11-15.
- Mia, M., Shamsuddin, Z., Mahmood, M. (2010). Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. *International Journal of Agricultural and Biological*, 12, 459-467.
- Montoya, D. (2010). Avances en biotecnología: Panorama y perspectivas. En: Sánchez, G., Uribe, M. (2013). El desafío de generar tecnología en el siglo XXI. La propiedad intelectual en el devenir histórico de Colombia. Cátedra Manuel Ancízar. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 181-201.
- Mujica, Y., Mena, A., Medina, A., Rosales, P. (2014). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants response to liquid biofertilization with *Glomus cubense*. *Cultivos Tropicales*, 35(2), 21-26.
- Nemogá, G. (2010). Biotecnología y el acceso a recursos genéticos. En: Sánchez, G.; Uribe, M. (eds.). (2013). El desafío de generar tecnología en el siglo XXI. La propiedad intelectual en el devenir histórico de Colombia. Cátedra Manuel Ancízar. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 181-201.
- Ocampo, D. (2012). Agrodiversidad: Conservación y uso como respuesta adaptativa al cambio climático. *Éxito empresarial*, 176, 1-3.
- Perfetti, J., Escobar, D., Castro, F., Cuervo, B., Rodríguez, M., Vargas, J. (2012). Consultoría Sobre Costos de Producción de doce Productos Agropecuarios. Fedesarrollo e IQartil. Bogotá. Disponible en Internet: [http://www.agronet.gov.co/www/html3b/public/boletines/COSTOS/IF%20Costos%20agropecuarios\\_2809.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/html3b/public/boletines/COSTOS/IF%20Costos%20agropecuarios_2809.pdf). (Con acceso 21/07/2015).
- Quezada, F. (2004). Posibilidades de la biotecnología para el uso sostenible de los recursos de biodiversidad en la región andina: recomendaciones y directrices estratégicas. Informe presentado a la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), noviembre de 2003, Santiago de Chile.
- Rangel, O. (2005). La diversidad de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. pp. 292-304. Disponible en Internet: <http://www.bdigital.unal.edu.co/14263/1/3-8083-PB.pdf>. (Con acceso 14/07/2015).
- Robertson, G., Vitousek, P. (2009). Nitrogen in agriculture: Balancing the cost of an essential resource. *Annual Review of Environment and Resources*, 34, 97-125.
- Ruan, L., Crickmore, N., Peng, D., Sun, M. (2015). Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*?. *Trends in Microbiology*, 23(6), 341-346.
- Sánchez, D., Lis, J., Campo, J., Herrera, J. (2013). Estudio sobre plaguicidas en Colombia. Estudios Económicos Sectoriales No. 7. Superintendencia de Industria y Comercio. Bogotá, Colombia.
- Schmidt, R. (1997). Managing Delphi surveys using nonparametric statistical techniques. *Decision Sciences*, 28(3), 763-774.
- Schmidt, R., Lyytinen, K., Keil, M., Cule, P. (2001). Identifying software project risks: An international Delphi study. *Journal of Management Information Systems*, 17(4), 5-36.
- Shankar, S., Gaiha, R., Jha, R. (2011). Information, Access and Targeting: The National Rural Employment Guarantee Scheme in India. *Oxford Development Studies*, 39(1), 69-95.
- Silva, L., Bermúdez, A., Castiblanco, D., Almario, F., Mojica, P., Cuéllar, S., Mediana, C., Tamayo, A. (2014). Tecnologías relacionadas con biofertilizantes. Banco de Patentes de Superintendencia de Industria y Comercio. 131p.
- Smith, S., Read, D. (2008). Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhiza. En: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press: London. pp. 42-90.
- Solleiro, J., Briceño, A. (2003). Propiedad intelectual II: El caso de la biotecnología en México. *Interciencia*, 28(2), 90-94.
- Stetsenko, L., Vedenicheva, N., Likhnevsky, R., Kuznetsov, V. (2015). Influence of abscisic acid and fluridone on the content of phytohormones and polyamines and the level of oxidative stress in plants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. under salinity. *Biology bulletin*, 42(2), 98-107.
- Tilman, D., Cassman, K., Matson, P., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671-677.
- Wagas, M., Khan, A., Hamayu, M., Shahzad, R., Kim, Y., Choi, K., Lee, I. (2015). Endophytic infection alleviates biotic stress in sunflower through regulation of defence hormones, antioxidants and functional amino acids. *European Journal of Plant Pathology*, 141(4), 803-824.
- Zambrano, D., Riaño, P. (2008). Rentabilidad de las empresas productoras de bioinsumos registradas ante el Instituto Colombiano Agropecuario -ICA. Documentos Técnicos IICA. Bogotá, Colombia. 25p.

# Efecto del anegamiento en la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en raíces de maracuyá amarillo *Passiflora Edulis* var. *Flavicarpa*

## Effect of waterlogging on the alcohol dehydrogenase activity in yellow passion fruit roots *Passiflora Edulis* var. *Flavicarpa*

Keren Natalia Giraldo Cervantes\*, Elisabet Ampudia Mesias\*\*±,  
Enrique Bravo, Montaña\*\*\*, Jaime Restrepo Osorio\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.45326

### Resumen

Bajo entornos naturales, las plantas de maracuyá amarillo frecuentemente se enfrentan a condiciones de anegamiento, un factor limitante para la producción generalizada de su cultivo, especialmente en tierras bajas inundables. El presente estudio se encargó de identificar la activación de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) durante la inundación, como un posible mecanismo de sobrevivencia de plántulas de maracuyá amarillo. Se evaluó la actividad de la enzima ADH durante 0, 1, 3, 7, 9 y 14 días de tratamiento con inundación y sin inundación, en raíces de plántulas de maracuyá amarillo de tres meses y medio de germinadas. En las raíces de plántulas de maracuyá amarillo en condiciones de inundación, la actividad de la enzima ADH presentó un aumento significativo respecto a las plántulas en condiciones normales de riego (sin inundación). Esto sugiere que la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa, implicada en el metabolismo anaeróbico, es un posible mecanismo de supervivencia al anegamiento de plántulas de maracuyá amarillo en periodos cortos de inundación.

**Palabras clave:** actividad enzimática, ADH, fermentación alcohólica, inundación, metabolismo anaerobio.

### Abstract

Under natural environments, yellow passion fruit plants often face flooded conditions as a limiting factor for the widespread production of the crop, especially in flood-prone lowlands. This study was carried out to identify the activation of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) during the flood, as a possible mechanism for the survival of yellow passion fruit seedlings. The activity of the ADH enzyme was assessed on days 0, 1, 3, 7, 9 and 14, with and without flooding, on rooted yellow passion fruit seedlings germinated during three and a half months. In the roots of the yellow passion fruit seedlings in flood conditions, the activity of the ADH enzyme showed a significant increase compared to seedlings under normal irrigation (no flooding). These results suggest that the activity of the alcohol dehydrogenase enzyme involved in anaerobic metabolism, is a possible mechanism for survival of yellow passion fruit seedlings waterlogged in short periods of flooding.

**Key words:** enzymatic activity, ADH, alcoholic fermentation, flooding, anaerobic metabolism

**Recibido:** enero 18 de 2015

**Aprobado:** septiembre 28 de 2015

\* Bióloga, Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. keren.giraldo@correounivalle.edu.co  
\*\* MSc., Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. ± Dirección de correspondencia: elisabet.ampudia@correounivalle.edu.co  
\*\*\* PhD., Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. enrique.bravo@correounivalle.edu.co  
\*\*\*\* PhD., Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. jaime.restrepo@correounivalle.edu.co

## Introducción

Durante la inundación o anegamiento, la transferencia de oxígeno y otros compuestos entre el suelo y la atmósfera se bloquea, y el poco  $O_2$  disuelto disponible en el agua es consumido por las plantas, fauna del suelo y microorganismos hasta su total agotamiento (Joshi & Kumar, 2012). Ante la baja disponibilidad de  $O_2$  (hipoxia) o ausencia de oxígeno (anoxia), se afecta el funcionamiento normal de las plantas, principalmente por la disminución de la síntesis de ATP, causando marchitamiento en las plantas anegadas (Sairam *et al.*, 2008). A pesar de la crisis energética que sufren las plantas ante la deficiencia de oxígeno por efecto de inundaciones, se han encontrado en diferentes especies de cultivo adaptaciones que les permiten tolerar las condiciones anaeróbicas provocadas por el anegamiento (Nishiuchi *et al.*, 2012). Entre estas adaptaciones encontramos cambios anatómicos como la formación de raíces adventicias con interconexiones longitudinales de espacios de gas llamados aerénquima, que permiten la aireación interna entre brotes y raíces (Voeseinek *et al.*, 2006), o la formación de barreras para evitar la pérdida radial de  $O_2$  a la rizósfera (Armstrong *et al.*, 2000). También se producen cambios metabólicos que incluyen disminución de la absorción y de la asimilación de fuentes de nitrógeno, activación de la respiración anaerobia, mantenimiento del suministro de carbohidratos para la respiración anaeróbica, control de la acidificación citoplasmática y desarrollo del sistema de defensa antioxidante (Chen & Qualls, 2003; Kumutha *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 1984), los cuales permiten a las plantas seguir creciendo y sobrevivir en entornos de poca disponibilidad de oxígeno (Medina *et al.*, 2009).

El oxígeno es vital para la producción de energía de la célula, y su presencia es determinante para las actividades metabólicas y la producción de ATP, al ser el aceptor de electrones en la vía de la fosforilación oxidativa. Es por esto que muchas de las investigaciones en plantas se han enfocado en la presencia y función de vías de fermentación como mecanismo de rescate metabólico cuando la respiración se detiene debido a la anoxia por el anegamiento del suelo (Dennis *et al.*, 2000). En plantas, las vías de fermentación no se presentan bajo condiciones normales de oxígeno, pero su rápida inducción por un bajo suministro de oxígeno sugiere un mecanismo de supervivencia ante la poca oxigenación. El sistema de raíces es el objetivo principal ante la deficiencia de oxígeno por el anegamiento, debido a los diversos trastornos metabólicos que ocurren en el tejido de la raíz, que en última instancia afecta al rendimiento global de la planta (Kulkarni & Chavan, 2013). Estudios de la respuesta de raíces de plántulas de maíz al tratamiento anaeróbico han revelado que la síntesis normal de proteínas solubles aeróbicas se reduce, mientras que un conjunto de 20 proteínas anaeróbicas (ANPs) se sintetizan selectivamente, siendo estas identificadas como enzimas que intervienen en

la glucólisis y en el metabolismo fermentativo (Sachs *et al.*, 1980). De este grupo de proteínas anaeróbicas, la enzima que cataliza la fermentación alcohólica, la alcohol deshidrogenasa (ADH), es la más estudiada, y su mayor inducción por efecto de la anaerobiosis se ha demostrado en especies de importancia económica como *Zea mays*, *Glycine max*, *Euterpe oleracea*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Pennisetum glaucum*, *Dioscorea cayenensis*, *Ipomoea batatas* y *Echinochloa crus-galli* (Borella *et al.*, 2014; Fukao *et al.*, 2003; Gaut & Clegg, 1991; Huang *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 1994; Menezes *et al.*, 1995; Oluoha, 1995; Wignarajah *et al.*, 1976). Este aumento significativo de la actividad de la enzima ADH, es una característica considerada de tolerancia al estrés por exceso de agua, razón por la cual es importante la exploración de mecanismos de resistencia a nivel metabólico en especies de importancia económica como el maracuyá amarillo, cuyo atributo podría ser utilizado en programas de mejoramiento del cultivo (Roorkiwal & Chand, 2012).

El maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg), es uno de los frutales de cultivo más apetecidos para el consumo en muchos países del mundo, encontrándose cultivos de gran producción en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Hawái, Taiwán, India, Sud-África, Sri Lanka, Kenia, Nueva Guinea y Australia (Potosí *et al.*, 2008). En Colombia, en el Valle del Cauca se tienen cultivos de maracuyá amarillo en áreas de siembra de 919 hectáreas, de las cuales 619 hectáreas (~67%) se encuentran al norte del departamento en los municipios de Roldanillo, La Unión y Toro, zona denominada distrito RUT. Esta zona del Valle del Cauca, correspondiente a una parte del valle geográfico del río Cauca, con una alta capacidad para producción agropecuaria, de tierras planas y fértiles, presenta ciertas limitaciones para su labrado debido a las variaciones del clima, con épocas de sequías e inundaciones, siendo estas últimas ocasionadas por el desbordamiento del río Cauca y sus tributarios (Sierra, 2008). Dichas inundaciones en el país, especialmente las presentadas en la segunda mitad del año 2010, y repetida en abril de 2011 por el denominado fenómeno de La Niña, generaron pérdidas parciales y totales de los cultivos de maracuyá amarillo en la zona (CORPOICA, 2011), pasando de tener el mejor rendimiento de cultivo de maracuyá del país en el 2010 con 35 ton/ha, a 8,6 ton/ha para el año 2011 (DANE, 2012). Teniendo en cuenta el efecto de las inundaciones sobre el rendimiento del cultivo de maracuyá, es de gran importancia intensificar el estudio direccionado al diseño de estrategias alternativas para mantener el cultivo en condiciones ambientales adversas con objeto de evitar la pérdida total de la producción de maracuyá.

Uno de los pilares importantes para desarrollar este tipo de estrategias es el entendimiento de los mecanismos que presentan las plantas para responder a determinado estrés, siendo la activación del metabolismo anaerobio una de las respuestas ante el estrés

por anegamiento. En el presente estudio se comparó la actividad de la enzima ADH de raíces de plántulas de maracuyá amarillo en condiciones de anegamiento y en condiciones normales de riego. Los resultados demuestran que la actividad de la enzima ADH en raíces de plántulas de maracuyá amarillo en condiciones de anegamiento difiere significativamente de las raíces en condiciones normales de riego. Este aumento significativo de la actividad de la enzima ADH en raíces de plántulas de maracuyá amarillo sometidas a condiciones de inundación, demuestran la presencia de una posible estrategia de sobrevivencia de las plántulas de maracuyá ante el anegamiento a corto plazo.

## Materiales y métodos

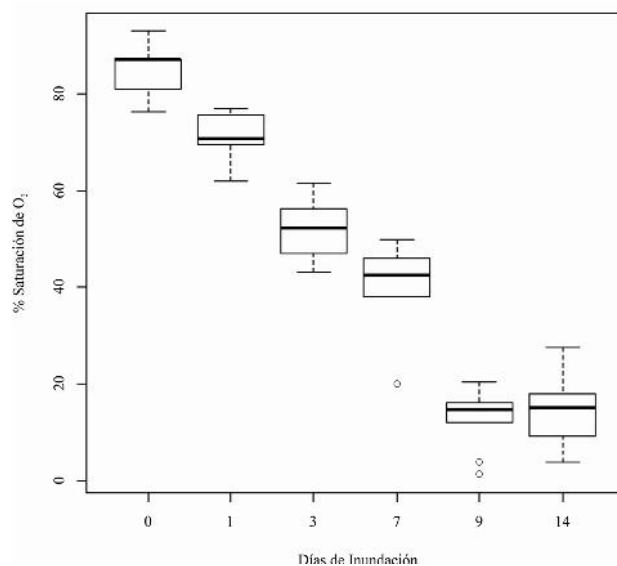
### Material vegetal y condiciones de crecimiento

Semillas de cultivo de maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) de la zona norte del departamento del Valle del Cauca fueron seleccionadas y proporcionadas por los agricultores del distrito de riego Roldanillo, La Unión y Toro (distrito RUT), en el valle geográfico del río Cauca. Estas se plantaron en bolsas de polietileno de 9 x 12" con sustrato de tierra enriquecido, tratado con fungicida TECTO 500 SC, y durante dos meses se mantuvieron con suficiente suministro de agua en el invernadero del Laboratorio de Suelos y Aguas (LASA) de la Universidad del Valle sede Meléndez. Después de los dos meses, se trasplantaron plántulas con altura entre 15 y 20 cm, en cubetas plásticas individuales de 12 litros, con las mismas condiciones de suelo y riego descritas anteriormente. Para el inicio del experimento se tomaron 18 plántulas de tres meses y medio desde que germinaron, y se seleccionaron aleatoriamente 9 de los contenedores para el tratamiento con inundación, condición que se logró mediante inundación del contenedor manteniendo la lámina de agua 2 cm por encima del nivel del suelo, y los otros 9 contenedores se mantuvieron en condiciones normales de riego. El experimento tuvo una duración de catorce días en condiciones semicontroladas en el invernadero del LASA, y para cada recipiente en condiciones de anegamiento se realizó el monitoreo del contenido de oxígeno disuelto ( $O_2D$ ) y temperatura ( $^{\circ}C$ ) del agua en cada unidad de tiempo, utilizando un oxímetro YSI 550A.

A partir de estas dos variables se determinó el porcentaje de saturación de  $O_2$  en el agua de los suelos del tratamiento de inundación, el cual mostró una disminución a lo largo del periodo del experimento (figura 1).

### Toma de muestras

Se tomaron muestras de 2 cm de la zona apical de las raíces en los días 0, 1, 3, 7, 9 y 14 para ambos tratamientos. Las muestras de raíz de plántulas con tratamiento de inundación al día 14 fueron tomadas



**Figura 1.** Porcentaje de saturación de oxígeno del agua en el tratamiento de inundación en las diferentes unidades de tiempo.

de raíces adventicias, menos de las plántulas designadas con los números 4 y 7, las cuales presentaron poca emergencia de dichas raíces (aproximadamente 0,3 cm de largo en promedio para cada plántula), en comparación con las demás que presentaron raíces adventicias de hasta 2 cm de largo. Las muestras fueron procesadas inmediatamente para el análisis bioquímico. Las muestras se tomaron de la zona apical de las raíces debido a su importancia en el metabolismo de la raíz y por su sensibilidad a la anoxia (Chen & Qualls, 2003).

### Extracción y ensayo de la alcohol deshidrogenasa (ADH)

La extracción y determinación de la actividad enzimática de la ADH (Alcohol: NAD oxidorreductasa, E.C.1.1.1.1) se realizó como se describe en Fukao et al. (2006). La proteína cruda se extrajo a partir de aproximadamente 100 mg de tejido fresco de cada muestra, con un mortero pre-enfriado sobre hielo y 0,4 ml de buffer de extracción frío que contenía Tris-HCl (pH 9,0) 100 mM,  $MgCl_2$  20 mM y mercaptoetanol 0,1 % (v/v). Los extractos fueron centrifugados por 15 min a 13500 rpm y posteriormente la fracción sobrenadante se analizó para la actividad enzimática de la ADH. La mezcla de la reacción (1,2 ml) incluía 60  $\mu$ l de extracto, Tris-HCl (pH 9,0) 50 mM y NAD 0,10 mM. El etanol (60  $\mu$ l) se añadió para iniciar la reacción, y la actividad de la ADH se determinó espectrofotométricamente a 340 nm por la reducción del  $NAD^+$  a temperatura ambiente por 2 min. Adicionalmente, se determinó la concentración de proteínas en los extractos crudos por el método de Bradford (1976), con BSA como estándar.

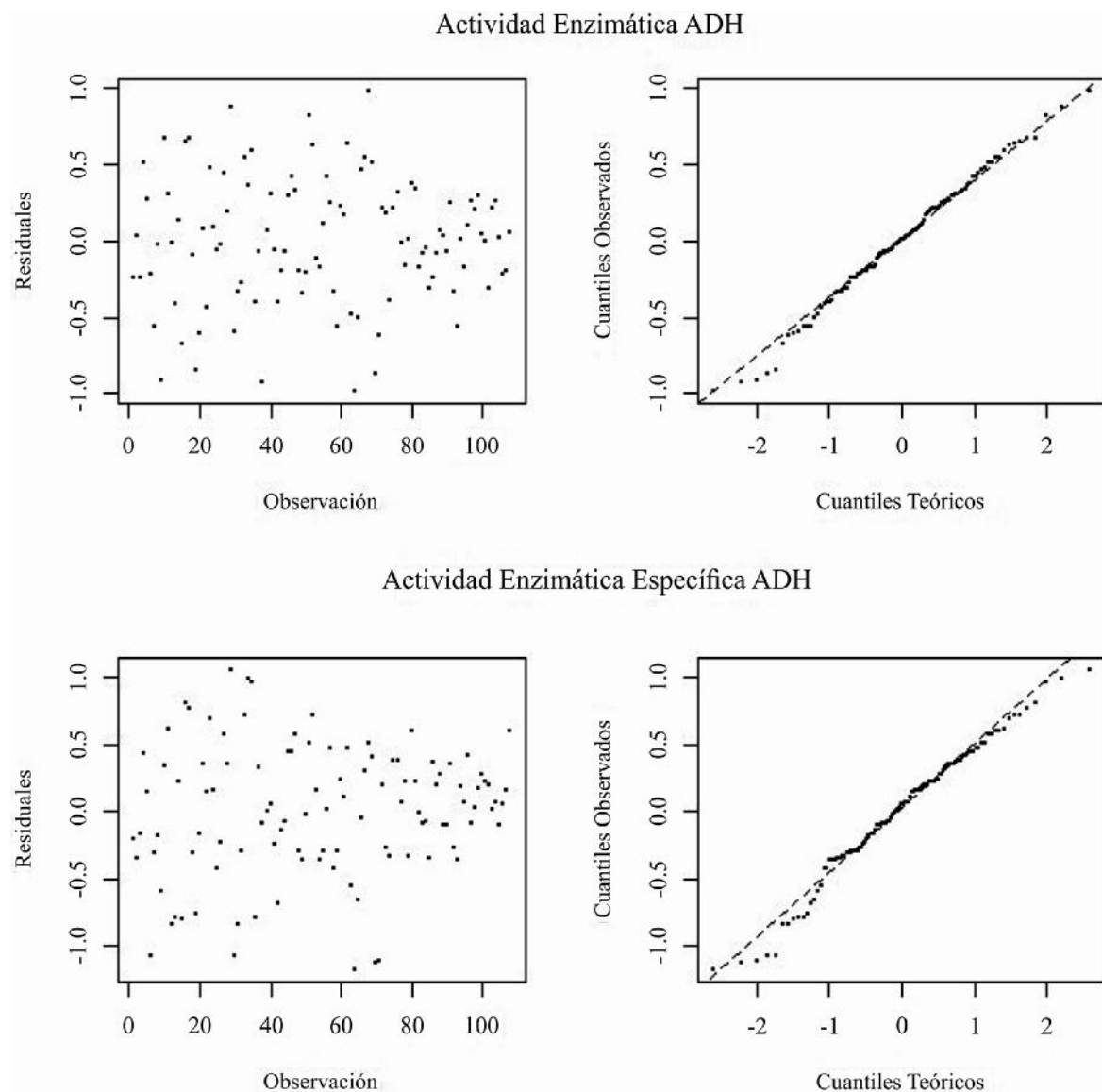


### Diseño del estudio y análisis estadístico

El experimento realizado fue exploratorio, con el ánimo de evaluar las diferencias de la actividad de la enzima ADH, de raíces de tres plántulas de maracuyá amarillo, en condiciones de inundación en comparación con tres plántulas en condiciones normales (sin inundación). El experimento fue realizado por triplicado y se realizó un análisis descriptivo para observar el comportamiento de los datos de actividad enzimática de las plántulas en el tratamiento con inundación y sin inundación y a través del tiempo de duración del experimento (unidad de tiempo: día 0, 1, 3, 7, 9 y 14). Teniendo en cuenta las medidas de las variables de respuesta (actividad enzimática y actividad enzimática específica de la ADH) en diferentes unidades de tiempo

po del experimento sobre cada unidad experimental (plántula) para ambos tratamientos, el análisis se planteó como un diseño de medidas repetidas para así poder controlar el efecto de tiempos desiguales sobre el desarrollo de la respuesta en cada plántula para cada tratamiento. Para efectos del análisis estadístico, no se tomaron en cuenta las variaciones de las repeticiones del experimento ya que no presentaron diferencias significativas.

Los datos fueron transformados por logaritmo natural (LN) para ajustarlos a un modelo lineal mixto de coeficientes aleatorios, cuyos residuales tienen una distribución normal multivariada y existe una homogeneidad en la varianza para ambas variables de respuesta (figura 2). A partir de los efectos fijos de las mediciones



**Figura 2.** Gráfico de residuales vs valores predichos, y de normalidad de las variables de respuesta actividad enzimática ADH y actividad enzimática específica ADH.

repetidas se estimó el modelo lineal para ambas variables de respuesta a lo largo del tiempo. También, se realizó un análisis de contraste entre mediciones repetidas para determinar la significancia en las diferencias encontradas entre los tratamientos, las unidades de tiempo y la interacción para los datos de actividad enzimática y actividad enzimática específica de la ADH. Por último, se determinaron las diferencias entre los dos tratamientos en cada día mediante comparación de efectos principales, permitiendo precisar el significado del efecto de la interacción tiempo-tratamiento (Arnau & Bono, 2008). Para estos análisis estadísticos se utilizó el PROC MIXED de SAS 9.3 bajo la licencia de la escuela de estadística de la Universidad del Valle.

## Resultados

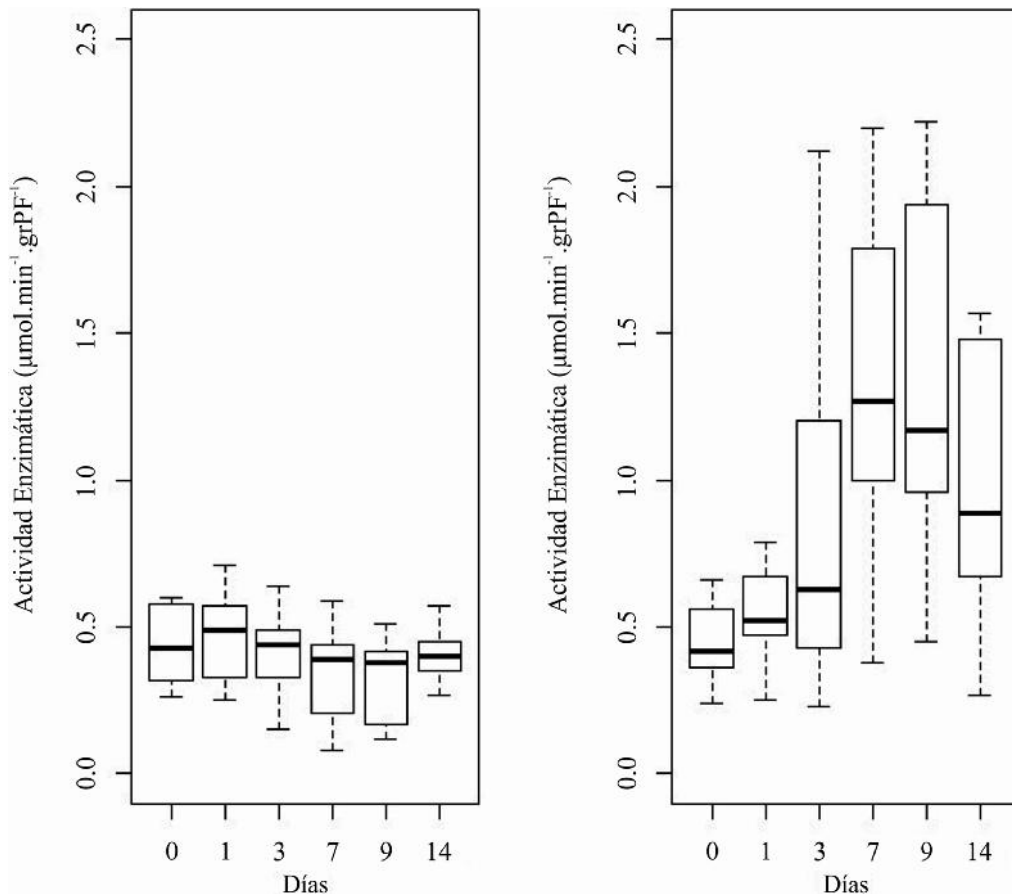
La actividad enzimática de la ADH en raíces de plántulas de maracuyá amarillo aumentó rápidamente después del primer día de inundación hasta el noveno día. Al día 14, la respuesta de la actividad de la ADH disminuyó un poco. Sin embargo, esta seguía siendo mayor, en comparación con la estabilidad de la actividad en las plántulas en condiciones normales, sin inundación (figura 3).

Después de 9 días de inundación, la actividad de la enzima ADH mostró el máximo incremento, de 3 veces respecto al tiempo 0 de inundación, y una alta variación de los datos. Por el contrario, en las plántulas sin inundar, la actividad de la enzima se mantuvo estable y con poca variación de los datos a lo largo del tiempo (tabla 1).

El análisis estadístico de los datos descritos en la figura 3 mostró que las diferencias encontradas en la respuesta de la enzima ADH a los tratamientos de inundación y sin inundación son significativas ( $P < 0,1$ ), al igual de las diferencias entre las unidades de tiempo y la interacción tratamiento-tiempo de la actividad enzimática (tabla 2).

Al comparar los valores de la actividad enzimática entre los tratamientos en cada unidad de tiempo se demostró que las diferencias significativas ( $P < 0,1$ ) se dan a partir del día 3 hasta el día 14 de finalización del experimento (tabla 3).

Teniendo en cuenta la respuesta de la actividad de la enzima en cada una de las plántulas del experimento, se encontró una respuesta variada a lo largo del tiempo en cada uno de los individuos de la población,



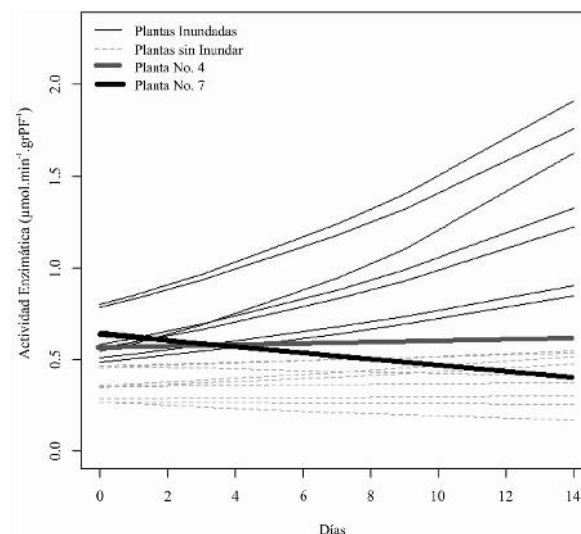
**Figura 3.** Diagrama de cajas de la actividad de la enzima ADH en las diferentes unidades de tiempo: Tratamiento sin inundación (izq.); Tratamiento con inundación (der.). grPF= gramo de Peso Fresco.

y es de destacar el gran aumento de la actividad de la enzima en las raíces de las plántulas inundadas en comparación con las no inundadas, y por otro lado, la poca variación de la actividad de la enzima en las plántulas No. 4 y 7, que además presentaron diferencias de formación de raíces adventicias mostrando una velocidad de emergencia menor (menos de 0,05 cm/día) con respecto al resto de las plántulas (aprox. 0,3 cm/día) en condiciones de inundación. La tendencia de la actividad de la enzima en la planta No. 7 es similar a la de las plantas en condiciones normales (sin inundación), y en la planta No. 4 tiende a aumentar la actividad de la enzima pero en menor proporción respecto al resto de plantas en condiciones de inundación (figura 4).

**Tabla 1.** Medias y desviación estándar de la actividad enzimática de la ADH de raíces de plántulas de maracuyá amarillo en cada tratamiento (Sin Inundación vs Inundación) por unidad de tiempo (día 0, 1, 3, 7, 9 y 14). Media  $\pm$  desviación estándar (DS).

Día	Actividad Enzimática ADH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gPF}^{-1}$ )	
	Sin Inundación	Inundación
0	0,43 $\pm$ 0,13	0,45 $\pm$ 0,15
1	0,47 $\pm$ 0,16	0,53 $\pm$ 0,17
3	0,41 $\pm$ 0,15	0,88 $\pm$ 0,60
7	0,34 $\pm$ 0,18	1,29 $\pm$ 0,58
9	0,33 $\pm$ 0,14	1,34 $\pm$ 0,63
14	0,40 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,45

El modelo encontrado finalmente para la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa a lo largo del tiempo en cada tratamiento (figura 5) muestra un patrón creciente en la respuesta de la actividad de la enzima en las plántulas de maracuyá amarillo por efecto del



**Figura 4.** Tendencia de la actividad enzimática de la ADH de cada plántula de maracuyá amarillo a lo largo del tiempo.

tratamiento inundación y del tiempo de exposición a la inundación, en contraste con el tratamiento sin inundación que no muestra una tendencia a aumentar sino a mantenerse a lo largo del tiempo.

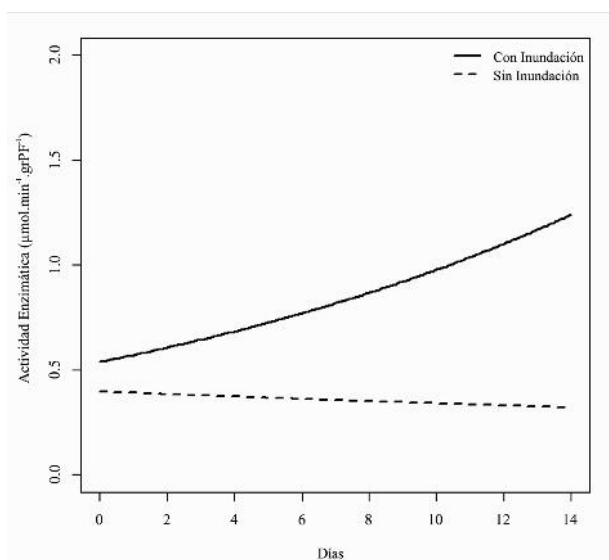
Por otro lado, tenemos que la actividad enzimática específica de la ADH muestra una tendencia a ser mayor en plántulas sometidas a inundación en comparación con las que se encuentran en condiciones normales, pero no se visualiza un efecto marcado a lo largo del tiempo (figura 6).

A pesar de que el contraste entre las mediciones muestra estas diferencias en el tratamiento pero no en el tiempo para la actividad específica, se encontró que hay un efecto de la interacción entre el tratamiento y la unidad de tiempo (tabla 2). El análisis de las diferencias de la interacción tratamiento-tiempo se observan en la tabla 3, donde se demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos con inundación

**Tabla 2.** Comparación de los efectos fijos y su interacción para las variables actividad enzimática y actividad enzimática específica de la ADH de raíces de plántulas de maracuyá amarillo.

Variable de Respuesta	Fuente de Variación	gl. Num. <sup>1</sup>	gl. Den. <sup>2</sup>	F	P_valor
Actividad Enzimática ADH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gPF}^{-1}$ )	Tratamiento	1	16	4,02	0,0622
	Tiempo	1	88	6,47	0,0127
	Tratamiento*Tiempo	1	88	18,41	<,0001
Actividad Enzimática Específica ADH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProteína}^{-1}$ )	Tratamiento	1	12,2	3,38	0,0905
	Tiempo	1	88	1,97	0,1642
	Tratamiento*Tiempo	1	88	3,22	0,0762

<sup>1</sup> Grados de Libertad del Numerador <sup>2</sup>Grados de Libertad del Denominador



**Figura 5.** Estimación del modelo para la variable de respuesta actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en los tratamientos inundación y sin inundación a lo largo del tiempo.

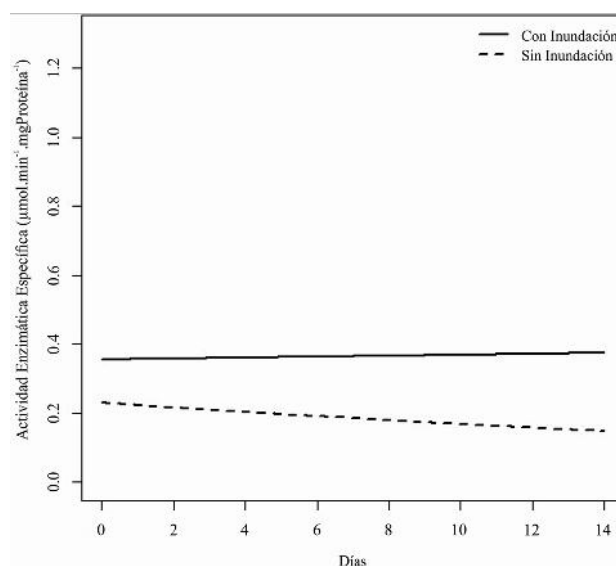
y sin inundación a partir del día 3 hasta el día 9 del experimento.

**Tabla 3.** Diferencias entre los tratamientos con inundación y sin inundación en cada unidad de tiempo para las variables de respuesta actividad enzimática y actividad enzimática específica de la ADH de raíces de plántulas de maracuyá.

Actividad Enzimática ADH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gPF}^{-1}$ )		Actividad Enzimática Específica ADH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgProteína}^{-1}$ )	
Unidad de Tiempo (día)	Pr >  t	Unidad de Tiempo (día)	Pr >  t
0	0,8693	0	0,6028
1	0,4661	1	0,3219
3	0,0386	3	0,0871
7	0,0002	7	0,0002
9	<.0001	9	<.0001
14	0,0015	14	0,28

## Discusión

La baja disponibilidad de oxígeno es un componente muy importante en la respuesta metabólica de las plantas ante el estrés por anegamiento. Estudios sobre el efecto de la inundación en la respuesta de la actividad de las enzimas del metabolismo anaerobio como la ADH sugieren esta respuesta como un me-



**Figura 6.** Estimación del modelo para la variable de respuesta actividad enzimática específica alcohol deshidrogenasa en los tratamientos inundación y sin inundación a lo largo del tiempo.

canismo de tolerancia al estrés debido al déficit de oxígeno (Agarwal *et al.*, 2007). La tendencia de aumento encontrada en la actividad de la enzima ADH de las raíces de plántulas de maracuyá amarillo ante el anegamiento, comparado con la actividad en condiciones normales, proporciona la evidencia de que la fermentación alcohólica en estas plantas se activa, como un mecanismo para la producción de energía en condiciones de estrés por la ausencia del oxígeno. La razón por la cual la fermentación alcohólica es de gran importancia durante la inundación es que en este proceso ocurre la regeneración continua de NADH en el citoplasma (Kimmerer, 1987). Por tanto el proceso de glicólisis continúa y se genera energía en forma de ATP para el mantenimiento del metabolismo de las raíces para la supervivencia de las plantas, ya que en ausencia de oxígeno (en condiciones anóxicas), el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa dependiente de la disponibilidad de oxígeno se bloquean (Hossain & Nasir, 2011).

A pesar de que se muestra una mayor actividad de la enzima ADH de las raíces de las plántulas de maracuyá en condiciones de anegamiento respecto a las condiciones normales de riego, se encontró que a lo largo del tiempo la actividad de la enzima aumenta solamente después del primer día hasta los 9 días de inundación y luego disminuye. La poca actividad enzimática durante el primer día de inundación posiblemente se debió a la disponibilidad de oxígeno aún presente durante ese periodo de tiempo, ya que al tener en cuenta los valores del porcentaje de saturación de  $\text{O}_2$  del agua de inundación (figura 1), se encontró que: según el estatuto de calidad del agua introducido por Dun-



nette desde 1979, el porcentaje de saturación de O<sub>2</sub> para el día 0 indica un buen entorno (75-89%), y para el día 1 indica una limitada disponibilidad de oxígeno (60-74%), mostrando que es menor respecto al día 0 pero aún está disponible para la planta. A partir del día 3 se empieza a tener un medio con escasa saturación de oxígeno (<60%) hasta el final del experimento al día 14, lo cual corresponde a la rápida inducción de la actividad de la enzima a partir de este día (3) hasta el día noveno. Se encontraron diferentes posibles causas por las cuales la actividad de la enzima en el día 14 muestra una menor actividad respecto al noveno día. El hecho de que las muestras de este día hayan sido tomadas de raíces adventicias y no de raíces subterráneas influye, ya que las raíces adventicias se encuentran cerca de la superficie del agua donde hay mayor disponibilidad de oxígeno disuelto, teniendo en cuenta que la cantidad de oxígeno disuelto en el agua es inversamente proporcional a la profundidad (Cifuentes & Torres, 2003). Por otro lado, existe la posibilidad, de que estas raíces adventicias generadas por las plántulas presenten espacios aéreos (aerénquima) que según el estudio de Escobar (2013) se generan en las raíces adventicias de maracuyá amarillo en condiciones de anegamiento, permitiendo de esta manera hacer uso del oxígeno disponible tanto de la superficie del agua como del oxígeno almacenado en los espacios aéreos para activar su metabolismo normal y disminuir la dependencia de obtención de energía por la vía fermentativa. Otra de las posibles razones por las cuales la actividad de la enzima fue menor al día 14, es el tiempo de exposición a las condiciones de anegamiento, donde estudios en *Arabidopsis* han mostrado que la actividad de la ADH es necesaria para la resistencia al anegamiento a corto plazo (Ellis *et al.*, 1999), es decir que su activación es importante solamente los primeros días de inundación. Comparando estos estudios con la respuesta de la actividad enzimática del ADH en maracuyá, se puede demostrar que este mecanismo de rescate por medio de la activación del metabolismo anaeróbico es de gran importancia para su supervivencia durante los primeros 9 días de inundación. Posiblemente, la inducción de la ADH para periodos de inundación mayores a 9 días no sea por sí sola la causa de supervivencia de las plántulas de maracuyá durante el anegamiento.

La respuesta de la actividad de la enzima ADH presentó una gran variación entre los individuos en el tratamiento de inundación, encontrando tanto plántulas que aumentaron significativamente su actividad enzimática, así como plántulas “como las numeradas 4 y 7” que presentaron la peculiaridad de manifestar una poca activación de la enzima respecto al resto de las plantas inundadas, y que de hecho no generaron raíces adventicias a la misma velocidad que el resto de las plántulas del experimento con tratamiento de inundación. Estas variaciones encontradas dentro de la población podrían sugerir una variabilidad genética

que esté generando este comportamiento de la actividad de la enzima ADH en los diferentes individuos. Por ejemplo, la característica observada en las plántulas No. 4 y 7 podrían relacionarse con la variación de un factor de inducción que afecta ambos atributos en las plantas (la actividad de la enzima ADH y la formación de raíces adventicias), donde la expresión de un gen puede influenciar y finalmente modular la respuesta a la inundación, en diferentes características incluyendo la respuesta de la fermentación etanólica (Fukao *et al.*, 2006), siendo esto una aproximación teórica de lo que podría estar sucediendo a nivel molecular para que se presenten las variaciones observadas en las plántulas de maracuyá amarillo en condiciones de inundación.

Este estudio provee evidencias de un posible mecanismo de sobrevivencia de plántulas de maracuyá amarillo a las condiciones de hipoxia o anoxia a corto plazo, consecuencia de la inundación, al activar la enzima ADH implicada en el metabolismo anaerobio, donde las plántulas anegadas presentaron una actividad enzimática de la ADH hasta tres veces mayor en comparación a las plántulas en condiciones normales de riego. Se propone la exploración de otros rasgos como son la presencia de barreras para evitar la pérdida radial de oxígeno y mecanismos de regulación y señalización a nivel molecular responsables de desencadenar respuestas consideradas de tolerancia a la inundación, lo cual será de relevancia para el conocimiento del comportamiento del cultivo de maracuyá en condiciones de anegamiento.

## Agradecimientos

Especialmente a la profesora Neyla Benítez directora del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM), por facilitar el espacio y material para la realización de los experimentos, al estadístico Diego Tovar por su valiosa ayuda en el análisis estadístico, y a los cultivadores del distrito RUT quienes proporcionaron las semillas. El presente trabajo se logró realizar en el marco del proyecto “Evaluación de los cambios en la Relación Agua-Suelo-Planta-Atmosfera (RASPA), en condiciones de anegamiento en la IFAN. Aplicado al caso Maracuyá – *Passiflora edulis*, post inundaciones 2010”. Agradecimiento a la Universidad del Valle que financió este proyecto y brindó infraestructura para desarrollar los diferentes procesos de este trabajo.

## Referencias

- Agarwal, S., A. Kapoor, O. S. Lakshmi & Grover, A. (2007). Production and phenotypic analysis of rice transgenics with altered levels of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 637-646.
- Armstrong, W., D. Cousins, J. Armstrong, D. W. Turner & Beckett, P. M. (2000). Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86, 687-703.

- Arnau, J. & Bono, R. (2008). Estudios longitudinales de medidas repetidas: Modelos de diseño y análisis. *Escritos de Psicología*, 2(1), 32-41.
- Borella, J., Amarante, L., Colares, D., Barneche, A. C. & Bolacel, E. J. (2014). Waterlogging-induced changes in fermentative metabolism in roots and nodules of soybean genotypes. *Sci. Agric.*, 71(6), 499-508.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Chen, H. & Qualls, R. G. (2003). Anaerobic metabolism in the roots of seedlings of the invasive exotic *Lepidium latifolium*. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 29-40.
- Cifuentes, J. & Torres, M. (2003). *El océano y sus recursos II. Las ciencias del mar*. México: Fondo de Cultura Económica.
- CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). (2011). *Estrategias de respuesta de CORPOICA para mitigar el impacto de las inundaciones sobre la agricultura colombiana. Rehabilitación de la capacidad productiva de los suelos afectados por las inundaciones, en el Valle del Cauca*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado de [http://www.palmira.gov.co/potpaigr/02.%20INFORMACION%20REGIONAL/Documentos%20consulta/Corpoica\\_Norte\\_del\\_Valle.pdf](http://www.palmira.gov.co/potpaigr/02.%20INFORMACION%20REGIONAL/Documentos%20consulta/Corpoica_Norte_del_Valle.pdf)
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). (2012). *Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Pasifloráceas en Colombia*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. Recuperado de [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos\\_factores\\_de\\_produccion\\_noviembre\\_2012.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_noviembre_2012.pdf)
- Dennis, E. S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F. U., Grover, A., Ismond, K. P., Good, A. G. & Peacock, W. J. (2000). Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 51 (342), 89-97.
- Dunnette, D. A. (1979). A geographically variable water quality index used in Oregon. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 51(1), 53-61.
- Ellis, M. H., Dennis, E. S. & Peacock, W. J. (1999). Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiology*, 119, 57-64.
- Escobar, J. S. (2013). *Características morfológicas y anatómicas de maracuyá (Passiflora edulis) sometida a anegamiento*. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Fukao, T., Kennedy, R. A., Yamasue, Y. & Rumpho, M. E. (2003). Genetic and biochemical analysis of anaerobically induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crus-galli* varieties tolerant and intolerant of anoxia. *Journal of Experimental Botany*, 54 (386), 1421-1429.
- Fukao, T., Xu, K., Ronald P. C. & Bailey-Serres, J. (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell*, 18, 2021-2034.
- Gaut, B. S. & Clegg, M. T. (1991). Molecular evolution of alcohol dehydrogenase 1 in members of the grass family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2060-2064.
- Hossain, A. & Nasir, S. (2011). Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Australian Journal of Crop Science*, 5(9), 1094-1101.
- Huang, Y., Picha, D. H. & Kilili, A. W. (2002). Atmospheric oxygen level influences alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activities in sweetpotato roots. *J. Plant Physiol.*, 159, 129-136.
- Johnson, J. R., Cobb, C. & Drew, M. C. (1994). Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of Adh1 Null *Zea mays*. *Plant Physiol.*, 105, 61-67.
- Joshi R. & Kumar, P. (2012). Lysigenous aerenchyma formation involves non-apoptotic programmed cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Physiol Mol Biol Plants*, 18(1), 1-9.
- Kimmerer, T. W. (1987). Alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activity in leaves and roots of eastern cottonwood (*Populus deltoids* Bartr.) and soybean (*Glycine max* L.). *Plant Physiol.*, 84, 1210-1213.
- Kulkarni, S. S. & Chavan, P. D. (2013). Study of some aspects of anaerobic metabolism in roots of finger miller and rice plants subjected to waterlogging stress. *International Journal of Botany*, 2013, 9 (2),1-6.
- Kumutha, D., Sairam, R.K., Ezhilmathi, K., Chinnusamy, V. & Meena, R.C. (2008). Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): Upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. *Plant Science*, 175, 706-716.
- Medina, C., Sanches, M. C., Tucci, M. L., Sousa, A. F., Cuzzuol, G. R. & Joly, C. A. (2009). *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses. *Annals of Botany*, 104, 671-680.
- Menezes, M. A., Donizeti, J. & Mota, L. E. (1995). Anaerobic metabolism of *Eutrope oleracea*. II plant tolerance mechanism to anoxia. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 7(1), 47-51.
- Nishiuchi, S., Yamauchi, T., Takahashi, H., Kotula, L. & Nakazono, M. (2012). Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. *Rice*, 5(2), 1-14.
- Oliveira, H. C., Freschi, L. & Sodek, L. (2013). Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 141-149.
- Oluoha, U. (1995). Purification and kinetic properties of alcohol dehydrogenase from yellow yam tubers (*Dioscorea cayenensis*). *Plant Science*, 107, 1-7.
- Potosí, C. T., Espinosa, F. & Guevara, P. C. (2008). *Comportamiento agronómico de maracuyá Amarillo Passiflora edulis var. flavicarpa en condiciones ambientales de sabana inundable, municipio de Arauca*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Orinoquia, Arauca, Colombia.
- Roberts, J. K. M., Callis, J., Jardetzky, O., Walbot, V. & Freeling, M. (1984). Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6029-6033.
- Roorkiwal, M. & Chand, P. (2012). Sequence similarity based identification of abiotic stress responsive genes in chickpea. *Bioinformation*, 8 (2), 092-097.
- Sachs, M. M., Freeling, M. & Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell*, 20, 761-767.
- Sairam, R. K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P. S. & Srivastava, G. C. (2008). Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia Plantarum*, 52(3), 401-412.
- Sierra, J. A. (2008, Marzo). Embalse de La Salvajina. Inundaciones otra vez. *Procaña*. Recuperado de [http://issuu.com/procana.org/docs/4\\_ded7b0d6224fff](http://issuu.com/procana.org/docs/4_ded7b0d6224fff)
- Voeseenek, L. A. C. J., Colmer, T. D., Pierik, R., Millenaar, F. F. & Peeters, A. J. M. (2006). How plants cope with complete submergence. *New Phytologist*, 170, 213-226.
- Wignarajah, K., Greenway, H. & John, C. D. (1976). Effect of waterlogging on growth and activity of alcohol dehydrogenase in barley and rice. *New Phytol.*, 77, 585-592.

# Estandarización de un protocolo para *Northern blot* no radioactivo usado en la detección de pequeños RNA en células Vero

## Standardization of *Northern blot* non-radioactive protocol used in the detection of small RNAs in Vero line cells

Natalia Campillo-Pedroza\*, Juan Pablo Franco Salazar\*, Juan Carlos Gallego- Gómez\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48522

### Resumen

El interés en la detección, identificación, y caracterización funcional de los pequeños RNAs no codificantes (sRNAs), ha generado la necesidad de optimizar las metodologías comúnmente usadas en su detección, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) y *Northern blot*, con el fin de que sean más sensibles y específicas. A pesar de la baja sensibilidad del *Northern blot*, esta metodología continúa siendo de uso común en la detección de sRNAs porque permite detectar el RNA pequeño así como a sus precursores, razón por la cual se usa como una metodología complementaria en este tipo de investigaciones. En este trabajo se describe la implementación de un nuevo protocolo para *Northern blot* no radioactivo, con modificaciones dirigidas a mejorar su sensibilidad y especificidad. El diseño de la sonda con la tecnología LNA, el marcaje de esta con Digoxigenina y por último la fijación del RNA a la membrana mediante 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboniimide (EDC) y finalmente se discuten los fundamentos teóricos de estos cambios.

**Palabras clave:** 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboniimide, Digoxigenina, *Northern blot* no radioactivo, Sondas LNA, sRNAs.

### Abstract

The interest in detection, identification and functional characterization of small non-coding RNAs (snRNAs), has generated the need to optimize the methodologies commonly used in its detection in specificity and sensitivity, The Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and *Northern blot*. Even though the low sensitivity of *Northern blot*, this method continues to be commonly used in the sRNAs, because its capacity to detect the sRNA and its precursor, which is the reason why *Northern blot* is used as complementary method in this sort of Research.

This work describes the implementation of an innovative non-radioactive *Northern blot* protocol, with modifications that improving the sensibility and specificity, with the discussion of the theoretical foundations of such modifications.

**Key words:** 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboniimide, Digoxigenine, *Northern blot* non-radioactive, LNA probe, sRNAs.

**Recibido:** enero 21 de 2015

**Aprobado:** octubre 23 de 2015

### Introducción

Los pequeños RNA no codificantes (sRNAs, small non-coding RNAs) son secuencias involucradas en diversas funciones celulares, tanto constitutivas como de regulación. Desde el descubrimiento del primer RNA pequeño, lin-4 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993),

la lista de pequeños RNAs no codificantes ha aumentado, reportándose la participación de alguno de ellos en procesos biológicos como corte y empalme de exones, traducción genética, desarrollo, diferenciación, muerte celular, control metabólico, defensa antiviral, regulación de expresión genética transcripcional y post-transcripcional (Gomes et al., 2013; van Wol-

\* Grupo de Medicina Molecular y de Traducción. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, Colombia. naticampillo@gmail.com, jp.salazar04@gmail.com, juanc.gallegomez@gmail.com.

fswinkel & Ketting, 2010; Winter et al., 2009). La función para muchos de estos sRNAs aún se desconoce, por lo cual el interés y la necesidad de su detección, caracterización y validación funcional continúan.

Las metodologías utilizadas para la detección de los sRNAs, enfrentan grandes desafíos impuestos por su tamaño ( $\leq 200$  nucleótidos) y el bajo nivel de expresión de los pequeños RNAs, que en algunos casos no supera el umbral de detección de las técnicas usadas hasta el momento. Por las limitaciones anteriormente mencionadas, los métodos más utilizados para la detección de sRNAs (RT-qPCR y *Northern blot*) deben ser constantemente optimizados para mejorar la sensibilidad, especificidad de detección y cuantificación.

El *Northern blot* es una metodología directa que permite la detección de los pequeños RNAs, sus secuencias precursoras o intermediarias, evaluar sus propiedades de expresión y determinar su tamaño Wang & Yang (2010) razón por la cual sigue siendo ampliamente usado. El proceso general del *Northern blot* consiste en extraer RNA total, separarlo por tamaño mediante electroforesis y transferir e inmovilizar en una superficie sólida (membrana). La sonda con secuencia complementaria al RNA de interés, es marcada con métodos radioactivos o no radioactivos, luego se incorpora en la membrana que contiene el RNA inmovilizado y finalmente la hibridación con la secuencia complementaria es detectada.

Para la metodología *Northern blot* se han publicado diferentes protocolos que varían principalmente en el diseño y marcaje de la sonda, donde comúnmente se utilizan sondas de DNA marcadas con fósforo radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ) (Gurman S Pall & Hamilton, 2008; Várallyay et al., 2008). Un nuevo protocolo para *Northern blot* no radiactivo denominado LED (LNA-EDC-DIG), fue reportado Kim et al. (2010), integra tres metodologías desarrolladas separadamente, que modifican a su vez tres aspectos del proceso determinantes de la especificidad y sensibilidad del *Northern blot*. Las modificaciones consisten básicamente en remplazar las sondas de oligonucleótidos de DNA, por sondas que contienen ácidos nucleicos bloqueados o no accesibles (Locked Nucleic Acid, LNA). La inmovilización del RNA en la membrana, que normalmente se hace con luz ultravioleta (UV), es remplazado por el uso de EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboniimide)). Adicionalmente, el uso de radioisótopos ( $^{32}\text{P}$ ), el método más común de marcaje de sondas, con el cual se deben asumir todos los riesgos de la radioactividad, es sustituido por el uso de Digoxigenina (DG).

Este nuevo protocolo aumenta la sensibilidad y especificidad en la detección de pequeños RNAs por *Northern blot*, por lo que su uso e implementación en los estudios de detección, caracterización y funcionalidad de nuevos sRNAs será de gran utilidad. Por lo anterior, la descripción de la implementación y modificaciones realizadas de este protocolo usado en la detección de

un RNA pequeño, así como la explicación y discusión de los fundamentos teóricos de las modificaciones planteadas son el objetivo de este trabajo.

## Materiales y Métodos

### *Extracción de RNA total a partir de células Vero*

Todas las extracciones de RNA total se hicieron con TRI-reagent (Sigma<sup>TM</sup>), de manera breve  $4 \times 10^6$  células Vero fueron lavadas con PBS 1X para eliminar proteínas, se re-suspendieron en 1ml de Trizol, se incubaron 3 minutos (min) a temperatura ambiente (TA), se adicionó 200 $\mu\text{l}$  de Cloroformo (Merck<sup>TM</sup>) y se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min, se tomó la fase acuosa y se adicionó Isopropanol frío, se incubó durante 10 min a  $-20^\circ\text{C}$ , nuevamente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min usando microcentrífuga (Eppendorf<sup>TM</sup>, 5810 R). El pellet se lavó con 1ml de Etanol al 75% con vortex suave, se centrifugó nuevamente a 10.700 rpm durante 5 min, se dejó secar el etanol a TA y posteriormente se re-suspendió el pellet en 100 $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC. Con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) se determinó pureza y concentración del RNA extraído.

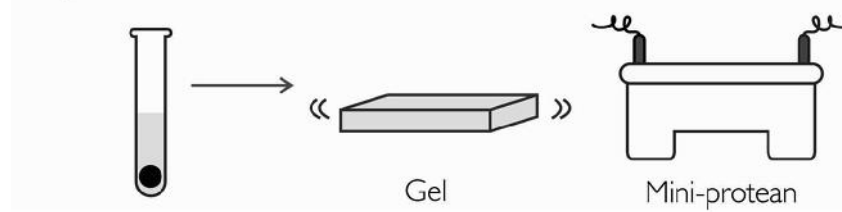
### *Northern blot no radioactivo*

El RNA extraído, fue evaluado por *Northern blot* no radioactivo. Para esto se modificó, implementó y estandarizó el protocolo para detectar miRNAs, previamente descrito Kim et al. (2010), el protocolo se desarrolló en 4 pasos (figura 1): **1)** Separación del RNA en gel de poliacrilamida, **2)** Transferencia e inmovilización del RNA, **3)** Pre-hibridación e Hibridación de la sonda, **4)** Detección del RNA. Para implementar el protocolo se usó una sonda específica y complementaria al RNA pequeño nuclear U6 (snRNA U6, del inglés small nuclear RNA) conteniendo nucleótidos modificados LNA (Exiqon<sup>TM</sup>), como control negativo se usó una sonda también de nucleótidos modificados LNA (Exiqon), pero en una secuencia desorganizada "Scramble".

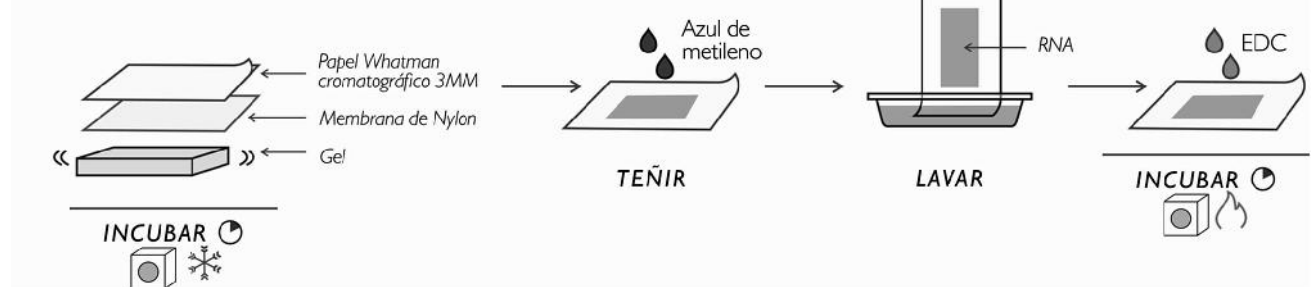
- 1. Separación del RNA.** Se hizo un corrido electroforético en gel de poliacrilamida 15% (desnaturalizante 7M de urea, Sigma<sup>TM</sup>) utilizando el sistema Mini-protean (BioRad<sup>TM</sup>, Hercules, CA, USA) y el marcador de peso molecular para miRNAs (New England BioLabs<sup>TM</sup> – miRNA marker). 2 $\mu\text{g}$  de RNA extraído, se mezclaron con tampón de carga (Gel Loading Buffer II, Sigma<sup>TM</sup>), las muestras y 5 $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular, se desnaturalizaron a  $95^\circ\text{C}$  durante 1 min, luego se cargaron en el gel y se corrieron aplicando 12.5 v/cm, en cámara de electroforesis MiniProtean (Biorad<sup>TM</sup>).
- 2. Transferencia e inmovilización del RNA.** Una vez finalizado el corrido electroforético, el RNA separado fue transferido a una membrana de Nylon



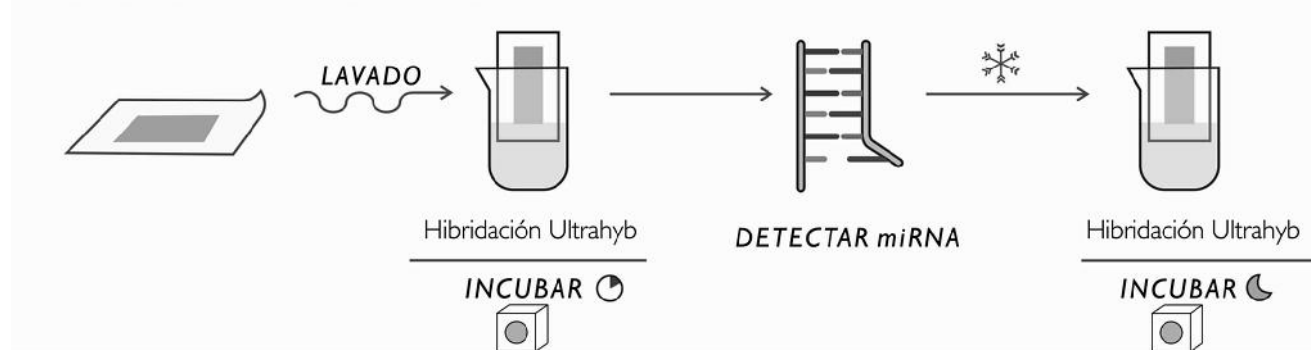
# 1. Separación del RNA



## 2. Transferencia e inmovilización del RNA



## 3. Pre-hibridación e hibridación de la sonda



## 4. Detección del RNA

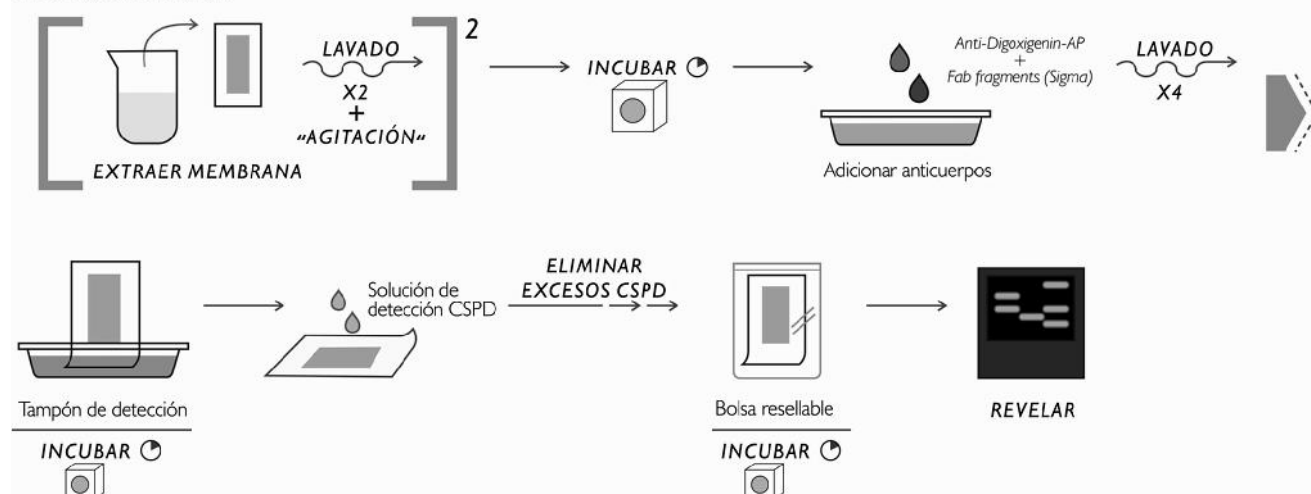


Figura 1. Esquema ilustrando el protocolo de Northern blot implementado.

cargada positivamente (Roche™), utilizando el equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad™), en este equipo se hizo un montaje tipo sándwich con 3 hojas de papel Whatman cromatográfico 3MM (Whatman), la membrana de Nylon, el gel y finalmente 3 hojas más de papel cromatográfico, luego se adicionó TBE 1X (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA). Para garantizar la transferencia, esta se realizó en cuarto frío a 15V durante 60 min. Transcurridos el tiempo de la transferencia, se evaluó si hubo transferencia del RNA a la membrana, tiñéndola con azul de metileno (0.02% azul de metileno, 0.3M NaOAc pH 5.5) durante 3 a 10 min, en este tiempo se observaron las bandas de RNA en la membrana, luego el azul de metileno se lavó con agua destilada. Posteriormente se inmovilizó el RNA en la membrana, para lo cual se humedeció una hoja de papel cromatográfico Whatman con solución EDC (para 24ml de EDC: 0.753gr de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide - Sigma, 245 µl de 1 Methylimidazole 12.5M, se aforó al volumen final en agua tratada con DEPC), y se incubó durante 1 hora a 65°C.

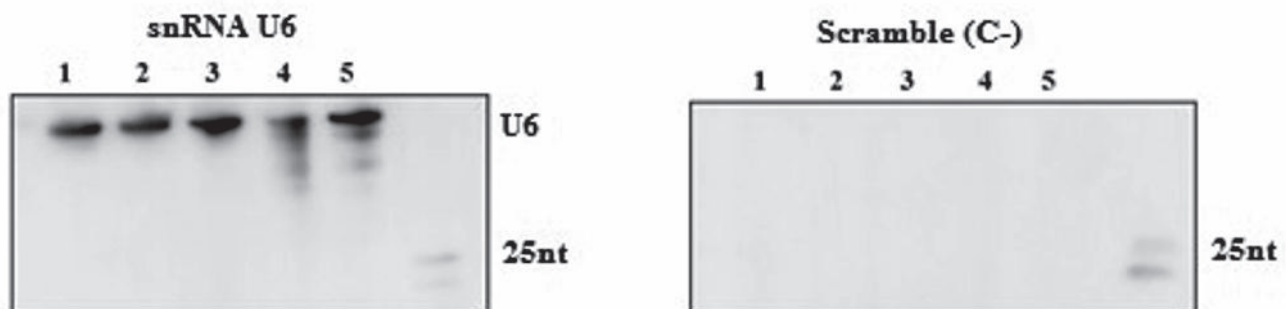
3. **Pre-hibridación e hibridación de la sonda.** Transcurrida la hora de inmovilización la membrana se lavó con Agua desionizada. Se precalentó a 65°C el tampón de hibridación Ultrahyb (Ambion), a cada botella de hibridación se adicionó 15ml del tampón, se introdujo la membrana conteniendo los RNA inmovilizados y se incubó durante 30 min a 37°C para pre-hibridar. Las sondas marcadas con Digoxigenina y Estreptavidina, para detectar el miRNA y el marcador de peso molecular, respectivamente, se desnaturalizaron a 95°C durante 1 min, se pusieron en hielo inmediatamente, se adicionaron a la botella de hibridación conteniendo la membrana con el RNA y se incubaron nuevamente a 37°C durante toda la noche.
4. **Detección del RNA.** Para realizar el proceso de detección se retiró la membrana de la botella de hibridación, se lavó dos veces con tampón de baja astringencia (2x SSC con 0.1% (p/v) SDS) a 37°C con agitación durante 15 min. Dos veces con tampón de alta astringencia (0.1x SSC con 0.1% (p/v)

SDS) a 37°C durante 5 min. Una vez con tampón de lavado (1x SSC) durante 10 min, luego se incubó a 37°C durante 3h en tampón de bloqueo (DIG wash and Block buffer set, Roche). Posteriormente se adicionaron los anticuerpos, Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Sigma) en dilución 1:15.000 y Estreptavidina (Promega) 1:4000, se incubaron durante 30min a TA. Después de incubar los anticuerpos la membrana se lavó con tampón de lavado (DIG wash and Block buffer set, Roche) cuatro veces durante 15 min a TA. Se incubó la membrana 5 min en Buffer de detección (DIG wash and Block buffer set, Roche) a TA, luego sobre el lado de la membrana que contiene el RNA, se adicionó la solución de detección CSPD (Roche) en dilución 1:100 se dejó a TA durante 5 min, posteriormente se eliminó el exceso de CSPD de la membrana y se introdujo en una bolsa sellable y resistente al calor (heat - sealeable bag) se incubó durante 15 min a 37°C, para proceder a su detección con cassette de revelado y películas de alta sensibilidad. Las películas se expusieron durante 30min y 1h para luego ser reveladas.

## Resultados y discusión

Con el protocolo descrito anteriormente se observó señal cuando el RNA fue evaluado con la sonda específica del snRNA U6 (figura 2), un RNA pequeño nuclear involucrado en el ensamblaje y funcionamiento del complejo de corte y empalme celular, con un tamaño aproximado de 150 nucleótidos (nt). Cuando se evaluó el mismo RNA con la sonda de control negativo Scramble (con nucleótidos desorganizados) no se observó señal (figura 5), lo que indica que la señal observada con la sonda complementaria al snRNA U6 es específica. Con lo anterior se demuestra la sensibilidad y especificidad del protocolo en la detección de un snRNA constitutivo celular.

Como se mencionó inicialmente en este protocolo se proponen cambios en tres aspectos que contribuyen a la especificidad, sensibilidad y seguridad de esta técnica, como son el tipo de sonda, su marcaje y el proceso de inmovilización del RNA en la membrana. Para entender la razón de las modificaciones realizadas y



**Figura 2.** Análisis de *Northern blot* para detectar el snRNA U6 en RNA extraído de células Vero.

con el fin de que este protocolo pueda ser implementado y modificado posteriormente, a continuación se explicarán y discutirán los fundamentos teóricos de los cambios realizados en el mismo.

### Diseño de sondas

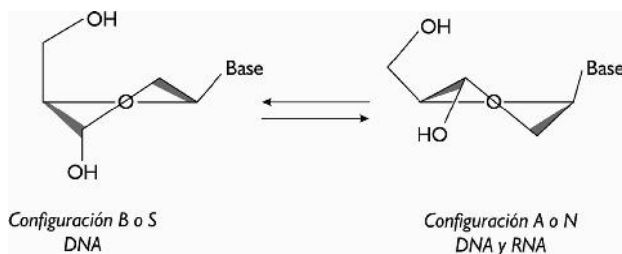
Cuando se diseñan y sintetizan moléculas similares a los ácidos nucleicos, como las sondas utilizadas en *Northern blotting*, tres características generales deben tenerse en cuenta: primero, las moléculas diseñadas deben ser eficientes en la oligomerización. Segundo, deben tener alta afinidad y reconocimiento selectivo del ácido nucleico complementario; esta propiedad puede ser medida por los valores de temperatura de fusión ( $T_m$ ), con altos valores menor afinidad, valores bajos mayor afinidad. Tercero, tener buena solubilidad en agua (Wengel 1999).

Para obtener sondas con oligomerización eficiente y alta afinidad en la hibridación con las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos, estas deben ser diseñadas de forma tal que la estructura de cada una de estas sondas tenga una configuración estructural lo más similar posible a la encontrada en los ácidos nu-

cleicos naturalmente Petersen *et al.* (2002). Los ácidos nucleicos naturalmente tienen dos configuraciones estructurales, el tipo A (también llamado tipo N) y el tipo B (también llamado tipo S). Estas conformaciones están dadas por los cambios de estructura en los azúcares de los nucleótidos (Wenge 1999). La ribosa (azúcar del RNA) normalmente se encuentra con configuración del tipo A, mientras que el DNA puede encontrarse en cualquiera de las dos configuraciones dependiendo del ambiente (fuerza iónica y humedad relativa) (Wengel 1999) (figura 3).

Por su parte los LNA (Locked Nucleic Acids) son nucleótidos modificados, su estructura se caracteriza por tener un puente de metileno que conecta el 2'-Oxígeno con el 4'-Carbono de la ribosa (figura 4). Este puente resulta en una conformación bloqueada C3'-endo, impidiendo que el nucleótido adopte otra configuración diferente a la A, configuración en la que se encuentra el RNA naturalmente (Gurman S Pall & Hamilton, 2008; Wengel 2009).

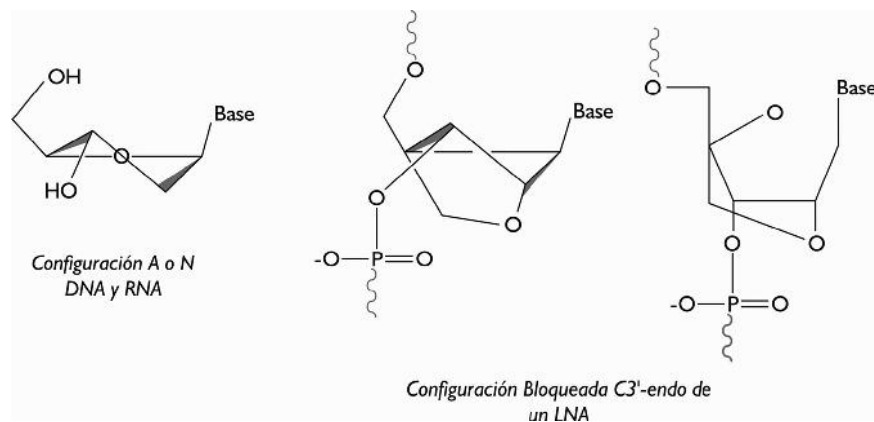
Esto hace que las sondas LNA usadas en el protocolo propuesto por Kim *et al.*, 2010 tengan alta afinidad y estabilidad térmica representada en bajos valores de  $T_m$  y mayor especificidad.



**Figura 3.** Esquema mostrando las configuraciones estructurales de los ácidos nucleicos. Configuración B o S, en la que se encuentra el DNA. Configuración A o N en la que se encuentran tanto el DNA como el RNA. Imagen tomada y modificada de Wengel, 2009.

### Inmovilización del RNA en la membrana

La inmovilización del RNA en la membrana inducida por UV sucede por el entrecruzamiento entre fracciones de residuos de uracilo y los grupos amino cargados positivamente presentes en la membrana Sambrook *et al.* (2001). El proceso tiene tres desventajas que afectan notablemente la detección de pequeños RNAs. Ocurre degradación por UV de los grupos funcionales (grupos amino de la membrana) requeridos para el apareamiento de bases. Los RNA se fragmentan, disminuyendo su longitud impidiendo conservar las secuencias completas, limitándose así la hibridación de las sondas. Como última desventaja, tenemos que el



**Figura 4.** Ilustración de la configuración estructural de un LNA. Con la formación del enlace C3'-endo el nucleótido permanece con configuración A o N, forma estructural en la que se encuentra el RNA naturalmente. Imagen tomada y modificada de (Wengel, 2009).

número de bases involucradas no puede ser controlado en la reacción inducida por UV, por esto podría ocurrir un entrecruzamiento excesivo, reduciendo la disponibilidad de bases para la hibridación con una sonda complementaria.

A pesar de lo anterior el entrecruzamiento entre RNA y membrana inducido por UV es rápido, poco costoso y eficiente para RNA con más de 70nt Gurman S Pall & Hamilton (2008). Sin embargo lo ideal para la detección por hibridación de pequeños RNAs, debe ser el acoplamiento de la secuencia de forma tal que permanezca completamente disponible para la hibridación con la sonda complementaria (Gurman et al., 2008; Gurman et al., 2007). El entrecruzamiento por medio del extremo 5' (diferentes modificaciones pueden encontrarse en el extremo 3', por esto se prefiere el 5' para un entrecruzamiento) de los pequeños RNAs, y no a partir de las bases nitrogenadas como sucede usando UV, es una alternativa. Este tipo de entrecruzamiento es posible realizarlo usando 1-Ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC), compuesto que previamente ha sido usado para entrecruzar el extremo 5' de oligonucleótidos sintéticos en diferentes sustratos sólidos Gurman Singh Pall et al. (2007). El uso del EDC en la inmovilización del RNA en la membrana dirigido a la detección de miRNA surge como una alternativa que mejora de manera notable la sensibilidad en la detección de estas pequeñas moléculas.

### Marcaje de sondas

El análisis de transferencia de *Northern blot* usando radioisótopos es la metodología usada actualmente para la detección de sRNAs, sin embargo, esta técnica generalmente es dispendiosa, costosa, implica riesgos ambientales y laborales, adicionalmente en nuestro país existe una justificada y seria exigencia para no promover el uso de radioisótopos. Como una alternativa, el sistema de marcaje (DIG)-Digoxigenina basa su sistema de detección en el proceso de quimioluminiscencia, lo que genera varias ventajas en comparación a las técnicas de marcado radioactivo, como: alta sensibilidad, tiempos cortos de exposición, vida útil más larga, y mayor seguridad (Ramkissoon et al., 2006).

### Conclusión

La creciente necesidad e interés de identificar, detectar, caracterizar y validar nuevos sRNAs, ha ido de la mano con la optimización y mejora de las metodologías utilizadas para tales fines, dándose lugar a protocolos como el descrito previamente. El conocer y entender los fundamentos teóricos por los cuales se optimizan protocolos como el descrito en este trabajo, aporta al desarrollo, planteamiento de nuevas optimi-

zaciones, a la creación de nuevos protocolos y metodologías que puedan ser consideradas en el desarrollo de investigaciones de este tipo.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación -COLCIENCIAS- por su apoyo en la realización de este trabajo, mediante la financiación del proyecto 111554531621. NCP tuvo financiación también de Colciencias como Joven Investigadora, durante el período 2010-2011. JCGG agradece a la Universidad de Antioquia, por la concesión de su Dedicación Exclusiva 2014-2015 para la Facultad de Medicina.

### Referencias

- Gomes, A. Q., Nolasco, S., & Soares, H. (2013). Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16010-39.
- Kim, S. W., Li, Z., Moore, P. S., Monaghan, a P., Chang, Y., Nichols, M., & John, B. (2010). A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Research*, 38(7), e98.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- Pall, G. S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L., & Hamilton, A. (2007). Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Research*, 35(8), e60.
- Pall, G. S., & Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature Protocols*, 3, 1077-1084.
- Petersen, M., Bondensgaard, K., Wengel, J., & Peter Jacobsen, J. (2002). Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA: RNA hybrids. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 5974-5982.
- Ramkissoon, S. H., Mainwaring, L. A., Sloand, E. M., Young, N. S., & Kajigaya, S. (2006). Nonisotopic detection of microRNA using digoxigenin labeled RNA probes. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 1-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Van Wolfswinkel, J. C., & Ketting, R. F. (2010). The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 11), 1825-39.
- Várallyay, E., Burgyán, J., & Havelda, Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature Protocols*, 3(2), 190-6.
- Wang, Z., & Yang, B. (2010). *MicroRNA Expression detection methods*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C-and 4'-C-Branched Oligodeoxynucleotides and the Development of Locked Nucleic Acid (LNA). *Acc. Chem. Res.*, 32, 301-310.
- Wengel, J. (2009). Locked Nucleic Acid Technology : A brief overview. *Exiqon*, 7.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-862.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228-34.



# Valoración de impacto ambiental en el Puerto Moa-Holguín

## Environmental impact assessment in Moa-Holguín Port

*Guilarte, A.\*; Díaz, A.\*\*; Nápoles J.\*\*\*; Fernández, O.\*\*\*\*; Abalos, A.\*\*\*; Pérez, R.M.\*\*\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54287

### Resumen

Las operaciones de descarga de los buques-tanques, la recepción y distribución de productos derivados del crudo de petróleo en el área de almacenamiento, el movimiento de insumos como el carbón antracita, amoníaco y azufre, la carga de lotes de minerales así como el mantenimiento de los tanques, conducen al vertimiento directo de hidrocarburos que afectan los diferentes ecosistemas en los cuales se encuentra situada la fuente contaminante. Se presenta la caracterización de los ecosistemas afectados por esta contaminación, atendiendo a los impactos ambientales identificados y la previa caracterización del área, utilizando herramientas de evaluación de criterios de expertos mediante la metodología Delphi. El estudio de impacto ambiental se realizó de forma cualitativa a través de las matrices causa-efecto, valoración e importancia del impacto. Los factores del medio más afectados fueron las aguas superficiales y subterráneas y la salud e higiene; las acciones más agresivas fueron la emisión de contaminantes (vertimiento al medio suelo de hidrocarburos/ liberación al medio aire de gases, ruidos y materiales particulados/ vertimiento y contaminación del acuatorio por arrastres de sedimentos, hidrocarburos y sustancias químicas) y la acumulación de residuos (creación de vertederos industriales).

**Palabras clave:** contaminación, evaluación, hidrocarburos, petróleo, estudio ambiental.

### Abstract

The operations of unloading ships the reception and distribution of products derivate of oil crude in the storage area, the movement of raw materials like coal anthracite, ammonia and sulphur, the load of lots of minerals as well as the maintenance of ships, direct leads to the appearance of hydrocarbons that affects the different ecosystems which he meets in once the contaminating source in the municipal Moa. It is present the characterization of ecosystems affected with oil's hydrocarbons, attending to environmental impacts identified by the expert group and the prior characterization of the area using assessment tools expert judgment using Delphi methodology. The environmental impact study was realized of qualitative form through matrix of cause-effect, valuation and importance of impact. The environmental factors of resulting surface/groundwater and health and hygiene the most attacked while impacts were more aggressive emissions (throwing to the ground hydrocarbons/ liberation to the midway air of gases, noises and materials in particles, throwing and contamination of the source for dragging of sediments, hydrocarbons and chemical substances) and accumulation waste (creation of drains industrials).

**Key words:** contamination, evaluation, hydrocarbons, petroleum, environmental study.

**Recibido:** febrero 23 de 2015

**Aprobado:** septiembre 23 de 2015

### Introducción

El éxito del comercio marítimo, industria pesquera y defensa naval, dependen del desarrollo de los puertos y bahías, por lo que es importante el correcto diseño, construcción y mantenimiento de estos recursos cos-

taneros y marinos. El desarrollo marítimo suele generar problemas ambientales locales sin embargo, puede producir problemas de escala regional.

Los impactos del desarrollo marítimo difieren según su ubicación, debido a las variaciones en tales rasgos

\* Centro de estudios del medio ambiente. Facultad de Geología y Minas. Instituto superior minero metalúrgico de Moa. Las Coloradas s/n, Moa, Holguín, Cuba. CP 83329. email: aguilarte@ismm.edu.cu

\*\* Empresa del Níquel "Comandante Che Guevara" Moa-Holguín. Cuba. CP 83329.

\*\*\* Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n. Santiago de Cuba. CP 90500. email: janet@uo.edu.cu, rmaria@uo.edu.cu, aabalos@uo.edu.cu

\*\*\*\* Empresa Puerto-Moa, Municipio Moa, Holguín.

como geografía, hidrología, geología, ecología, industrialización, urbanización y tipos de embarque.

La alteración de las aguas naturales y la construcción de estructuras artificiales, puede derivar en impactos sobre la masa de agua existente, así como el origen de impactos directos e indirectos sobre los ecosistemas y comunidades correspondientes en las cercanías de los puertos. Las operaciones como el dragado, creación y eliminación de materiales, desarrollo de las zonas playeras, tránsito marítimo y vehicular en el puerto, pueden provocar la liberación de contaminantes naturales y antropogénicos al ambiente (Viñas et al., 2001; Guédez et al., 2003).

La empresa Puerto Moa constituye un eslabón fundamental dentro de la infraestructura del grupo empresarial “Cubaníquel” donde su función fundamental es la recepción y almacenamiento de los productos o insumos de la importación para el consumo industrial de las empresas del níquel del territorio y la exportación de los productos ya terminados de estas industrias productoras. Es relevante declarar el importante papel natural, sociocultural y socioeconómico que remite esta institución, pues se identifican especies florísticas con un desempeño ecológico vital para el mantenimiento del entorno, la línea costera y las especies faunísticas existentes, significativa generación de empleos permanentes tanto en áreas productivas como administrativas que refleja un notable aumento de la calidad de vida del sector de la población que en la misma labora, además es pilar fundamental para el crecimiento económico del país.

De aquí que la actividad marítima portuaria ocasione un impacto negativo al ecosistema costero, lo que está asociado no sólo a la ausencia de sistemas de tratamiento, a la actividad de dragado y no existencia de un sistema de alcantarillado adecuado; sino también a la sinergia de los impactos ambientales de toda la actividad económica.

La evaluación de impacto ambiental (EIA) es uno de los instrumentos para materializar la política ambiental, tie-

ne un carácter preventivo si se realiza desde que se concibe el proyecto, previendo que el impacto ambiental de la actividad a desarrollar modifique el medio ambiente (Wilkins, 2003; García-Cuellar et al., 2004; Ramakrishna y Viraraghavan, 2005). La información que brinda permite analizar las consecuencias ambientales de un proyecto que unido a una valoración social y económica, definen las decisiones sobre la viabilidad del mismo. Uno de los métodos para realizar la EIA son las matrices causa – efecto o de interacción, muy útiles para identificar el origen de diferentes impactos, así como la matriz de valoración de impactos, que permite obtener una valoración cualitativa de la importancia de estos y por último, la matriz de importancia de impactos (Barker y Wood, 1999; Orozco et al., 2004; Nápoles et al., 2005).

Teniendo en cuenta que las empresas portuarias son responsables por la carga y descarga de los buques internacionales, a través de los cuales se realiza la exportación e importación de productos e insumos, y que para cumplir con sus funciones manipulan cantidades apreciables de hidrocarburos, este trabajo tiene como objetivo realizar la valoración del impacto ambiental que origina la actividad portuaria en la bahía Moa del municipio Moa, provincia de Holguín.

## Materiales y métodos

### Caracterización de la zona objeto de estudio

Para llevar a cabo la caracterización de la zona de estudio, se realizó un análisis de la infraestructura, actividad socioeconómica y movimientos de insumos, así como posibles focos de contaminación (figura 1). También se identificaron los potenciales impactos que son generados al ambiente, seleccionando los componentes interactuantes. Así como el conjunto de elementos ambientales del entorno físico, biológico y socioeconómico-cultural, que intervienen en dicha interacción según Milán, 2004.



**Figura 1.** Imagen aérea de la ubicación del Puerto Moa/ \*Focos de contaminación identificados referentes a la actividad portuaria.

**Infraestructura del Puerto:** se valora a través del organigrama (instrumento) general de la empresa previamente caracterizado, se identifican y se valoran según su funcionamiento en el mismo las áreas de impacto para el estudio. La empresa se encuentra organizada estructuralmente por cuatro áreas de regulación y control y siete unidades empresariales básicas (UEB).

**Actividad Socioeconómica y Movimiento de insumos:** identificado a través del grupo de expertos del puerto y el objeto de trabajo y funciones de las unidades (tales como: servicios de explotación portuarias, servicios de transportación, recepción de suministros) sometidas a valoración. Las variables analizadas y previamente identificadas fueron: descarga de petróleo desde los tanqueros a la base/ labores de limpieza, drenaje, reparación y drenajes de los tanques de almacenamiento/trasiego y suministro de petróleo y de sustancias químicas a consumidores/descarga de amoníaco desde el buque a la base/preparación de soluciones químicas/descarga de carbón desde el buque a la base/operación de beneficio del carbón/transporte de carbón a la planta para consumo.

**Focos de Contaminación:** identificados a través del grupo de expertos del puerto y caracterizado por los principales elementos contaminantes en ellos existentes y los factores del medio que los mismos contaminan reflejados en la matriz causa-efecto.

### Evaluación de impactos

La determinación cualitativa de los impactos ambientales se determinó a partir del uso de matrices en tres etapas: 1. Identificación de los impactos y los factores del medio afectados; 2. Valoración de los impactos y 3. Cálculo de la importancia de los impactos (Milán, 2004).

#### Etapas 1: identificación de impactos

Para el análisis de impactos, se efectuó el desglose de estos en sus diferentes etapas, actividades, hasta la identificación de acciones, entendiendo estas últimas como la unidad capaz de establecer una relación

causa-efecto con el entorno o ambiente que lo rodea (tabla 1). La identificación de las acciones susceptibles de generar impactos, se analizó a partir de la caracterización general de las empresas, y poder determinar cuáles son las posibles actividades negativas del trabajo por parte de los individuos que en estas laboran y que puedan trasladar los posibles impactos generados. Esto derivó en identificar los factores del medio impactados (terrestre, acuático y atmosférico) existente en el área de estudio, se seleccionaron los de mayor incidencia mediante la observación directa del grupo de expertos y su anotación en la matriz causa-efecto según Conesa (2000).

**Tabla 1.** Matriz Causa -Efecto.

Factores del medio		Impactos	
Nombre	Clave	I <sub>i</sub>	I <sub>n</sub>
	M <sub>i</sub>		
	M <sub>n</sub>		

#### Etapas 2: valoración de los impactos

La valoración de los impactos se realizó mediante un análisis detallado de las interacciones entre los factores del medio afectado y las acciones impactantes del mismo, utilizando como guía metodológica el cuadro de valores de los atributos de impactos (tabla 2) para realizar la evaluación cualitativa (Oñate et al., 1998; Conesa, 2000; CICA, 2001).

#### Etapas 3: cálculo de la importancia de impacto

Se elaboró el modelo de matriz de importancia de impactos (tabla 3) donde se recogen cada uno de los resultados calculados a partir de la matriz de la valoración de impactos. Se considera utilizar la importancia de impactos como una función directamente proporcional al grado de alteración producido por un impacto ambiental en el medio ambiente y expresar la importancia como el porcentaje de alteración con

**Tabla 2.** Matriz de valoración de impactos

Matriz para la valoración de impactos													
Impactos	Atributos a evaluar											Importancia	Máximo Valor de importancia
	Naturaleza	Intensidad	Extension	Momento	Persistencia	Reversibilidad	Acumulación	Probabilidad	Efecto	Periodicidad	Perc. Social		
	Signo	I	EX	MO	PE	RV	AC	PB	EF	PR	PS		

respecto a la alteración máxima posible. Se hace uso del sistema establecido según Conesa (2000) para realizar el proceso de discriminación, y buscar un mayor grado de precisión al establecer la importancia de los impactos, valorando lo siguiente:

En los impactos negativos determinar: valor medio ( $V_m$ ) y desviación típica ( $\sigma$ ), considerando como valor crítico del impacto ( $V_{cr}$ ) todos aquellos cuyo valor de importancia ( $V_i$ ) fuera superior a  $V_m + \sigma$ . O sea:

$$V_{cr} = V_i > V_m + \sigma \quad (1)$$

Asimismo, se consideró valorar como irrelevantes ( $V_{ir}$ ) aquellos impactos cuyos valores de importancia ( $V_i$ ) fueran inferiores del valor medio ( $V_m$ ) menos la desviación típica ( $\sigma$ ). O sea:

$$V_{ir} = V_i < V_m - \sigma \quad (2)$$

De esta forma se obtuvo el rango de discriminación, que no pre-establece valores absolutos de importancia, sino que se concibe como una función de las características de cada proyecto que se evalúe.

### Validación de los criterios de expertos.

#### Aplicación del método Delphi

La validación de los criterios de expertos se realizó por el método Delphi o Delfos (el cual data de 1963-1964) presentado por la Rand Corporation y en particular por Olaf Helmer y Dalkey Gordon, siendo el que más

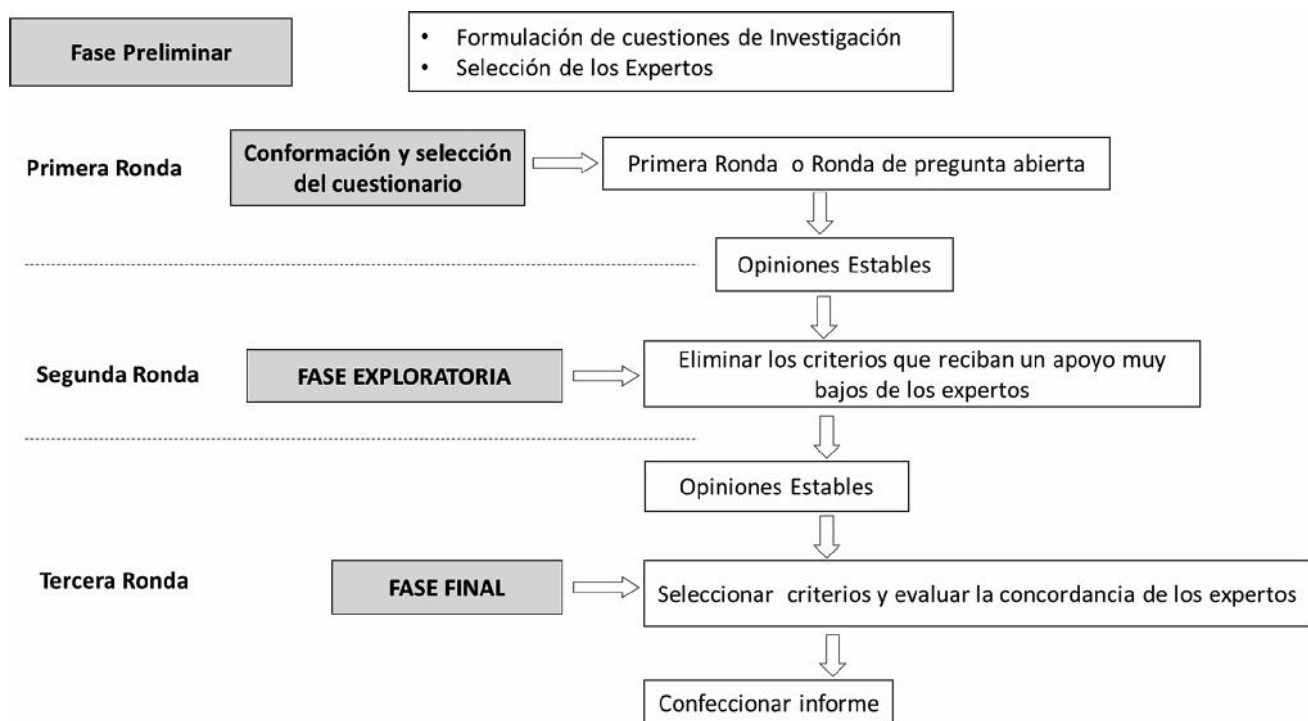
se ajusta al juicio intuitivo de expertos en materia ambiental (Linstone y Turoff, 2002). El mismo se aplicó seleccionando al grupo de expertos los cuales se sometieron a una autoevaluación de información y argumentación que poseen sobre el tema, utilizando la metodología requerida.

### Selección de los expertos

La selección del grupo de expertos se realizó previa identificación de los individuos (investigadores en temas de medio ambiente) con pertinencia y competencia en el área del conocimiento investigado, sobre la base de su currículo personal. Inicialmente se consideró un valor total de 10 expertos pertenecientes al Puerto Moa y de centros de estudios de biotecnología y medio ambiente de la Universidad de Oriente y el Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa.

### Instrumento

Se aplicó a los expertos, como instrumento, un cuestionario elaborado con base en el campo de acción de la investigación, el cual agrupa los ítems entorno a dos temas: 1. Experiencias obtenidas en la investigación de estudios de evaluación de impactos y 2. Pertinencia y objetividad de los trabajos desarrollados a raíz de su investigación individual o colectiva. Para procesar la información recogida en el cuestionario y realizar los pases de rondas establecidos se utilizó una aplicación



**Figura 2.** Representación de las fases metodológicas para la evaluación de expertos en temas ambientales.



**Tabla 3.** Matriz de importancia de impactos.

Factores del medio		Impactos			Valor alteración	Max valor alteración	Grado alteración
Nombre	Clave	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>n</sub>			
	M <sub>1</sub>						
	M <sub>2</sub>						
	M <sub>3</sub>						
Valor Medio de Importancia							
Dispersión Típica							
Rango de discriminación							
Valor de alteración							
Valor Max. alteración							
Grado de alteración							

informática elaborada a partir del método Delphi, versión 1.0 (Oñate *et al.*, 1998).

### Procedimiento

Se estableció la metodología a seguir, como se describe en la figura 2. La fase preliminar delimita el tema de estudio, concibiendo inicialmente el problema de investigación, donde se selecciona el grupo de expertos y la supervisión de la investigación. La fase exploratoria, incluye el cuestionario para validar el objetivo de la presente investigación, mientras que la fase final sintetiza los resultados de todo el proceso de selección, validación y evaluación mediante la concordancia y consulta a los expertos, sometiendo a evaluación las variables definidas con anterioridad en la segunda ronda (Oñate *et al.*, 1998; Linstone y Turoff, 2002).

## Resultados y discusión

### Caracterización del área de estudio

El municipio Moa perteneciente a la provincia de Holguín de la Isla de Cuba, con una extensión territorial de 766,33 km<sup>2</sup>, limita al norte con el Océano Atlántico, al Oeste con los Municipios de Frank País y Sagua de Tánamo, al Este y Sur con los Municipios de Baracoa y Yateras. La parte llana de Moa tiene más de 40 km bañados por las aguas del mar, y en ella se encuentran 4 bahías (Bahía de Moa, Bahía de Cañete, Bahía de Yaguasey y la Bahía de Yamanigüey).

El puerto Moa, cuenta con instalaciones para la recepción de mercancías y combustibles por donde se realizan maniobras para el movimiento de insumos, incluyendo los combustibles (fuel oil) mediante estructuras que transportan el mismo. Ésta tiene como función fundamental la carga y descarga de buques de travesía

internacional, a través de los cuales se realiza la exportación de níquel e importación de insumos como: crudo fuel oil, carbón antracita, azufre en estado sólido, entre otros; que son fundamentales para dicha industria. Además brindan servicios de maniobras, dragado, almacenaje y distribución de materias primas (carbón, amoníaco, combustibles, azufre, etc.) servicios de minería y transportación de coral, entre otros.

En tal sentido es que la actividad marítima portuaria ocasiona un impacto negativo al ecosistema costero, que está asociado a la no existencia de sistemas de tratamiento de residuales líquidos y residuos sólidos, a la carencia de sistema adecuado de alcantarillado, pero también a la sinergia de los impactos ambientales de toda la actividad económica que se realiza, y en gran medida a su elevada actividad productiva y capacidad de carga comparado con otras entidades homólogas de la región.

Estudios previos en la empresa Puerto Moa correlacionan que diferentes variables (aguas residuales, materiales industriales y residuos sólidos) eventualmente provocan impactos ya conocidos, generados por actividades en los buques como el aumento de contaminantes liberados por re-suspensión y dispersión de sedimentos e introducción en la columna de agua, aumento de los sedimentos suspendidos por arrastre según corrientes marinas imperantes en el área de vaciado y por la afectación a las especies existentes en la barrera coralina cercana a la entrada del canal (García *et al.*, 2013).

También actividades generadas desde el puerto ocasionan la modificación del relieve del fondo en el área de vaciado, debido a la deposición del material extraído, cambios en la circulación de las corrientes marinas como consecuencia de la modificación de la batimetría, afectación a las especies existentes en la

barrera coralina cercana a la entrada del canal y alteración en algunas especies de peces por ingestión y acumulación de metales pesados.

Es una zona afectada por la actividad de origen antrópico, básicamente industrial, que extiende su influencia a decenas de kilómetros de distancia en las direcciones predominante del viento, provocando la presencia de altos contenidos de sustancias nocivas, tales como CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> y partículas, que aún en bajas concentraciones pueden llegar a afectar no solo la calidad del aire, sino la del suelo, la biota de los ecosistemas así como la salud de la población.

Al Este de la empresa portuaria se encuentra un pequeño parche de Bosque de Galería (Bosque Tropical Ombrófilo aluvial), bordeando el manglar de variante baja. La pequeña área que ocupa, da una medida de la modificación que ha sufrido el bosque; observándose la vegetación original de individuos de *Bucida spinosa* Jenn (júcaro espinoso), *Calophyllum rivulare* Bisse (ocuje) en el estrato arbóreo superior con una altura de 10 a 15m (García et al., 2013).

En la zona de costa baja que rodea al oeste, predomina *Rhizophora mangle* (L.) Mey (mangle rojo) con una altura que oscila entre 4-8 m, también hay individuos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Patabán) detrás de la vegetación de costa arenosa en dirección a tierra.

Aparece la segunda variante, en zonas bajas con sedimentos lateríticos recientes, muy pobres en minerales y en materia orgánica, formado exclusivamente por plantas de *Rhizophora mangle* L., que alcanza menos de 2 m de altura. En la zona costera al Este se encuentra la presa de colas de la industria del Níquel. El área tiene grandes modificaciones debido a severos impactos negativos y una muestra de ello es que en el Bosque de Galería solamente se encontraron tres especies endémicas: *Sabal parviflora* Becc., *Ficus membranacea* Wright y *Bucida spinosa* Jenn (García et al., 2013).

Entre los factores que han influido en la afectación de esta formación, además de la tala indiscriminada de las especies arbóreas, está la propia actividad de construcción de las instalaciones del puerto. Otro factor que ha influido aceleradamente en los últimos años es el vertimiento de residuales de petróleo procedentes de las instalaciones de la Base de Petróleo, que ha provocado la muerte de gran número de individuos de júcaro espinoso y ocuje. Podemos apreciar en la (figura 3) como las raíces pivotantes de la barrera de mangle están cubiertas por una capa considerablemente gruesa de hidrocarburos y desechos industriales oleosos, esto a corto y largo plazo provoca la desaparición progresiva de individuos, el deterioro irreversible de ecosistema costero asociado y la posibilidad inminente de ser una región con peligro, vulnerabilidad y riesgo de desastres de origen natural. Este resultado se obtuvo principalmente a través de un inventario taxonómico detallado de las especies encontradas en las áreas de

estudio por los expertos pertinentes y del análisis y comparación de registros históricos del lugar.

La fauna aún no ha sido estudiada con profundidad, pero se observan invertebrados como insectos, arácnidos, crustáceos, miriápodos y otros. Problemática también válida para el grupo de los moluscos terrestres, los cuales han sido poco estudiados (García et al., 2013).

En la zona costera del puerto los manglares presentan una situación no muy favorable debido a la contaminación del suelo que ha provocado la alteración de propiedades físico-químicas y erosión del mismo; la alteración por inundación y salinidad conllevan a la defoliación, fragmentación del hábitat, variación de la composición florística del mangle y compactación del suelo. Todo lo anterior ha provocado disminución de la fauna asociada, alteración de escurrimiento superficial, pérdida de suelo del manglar, disminución del valor escénico del paisaje, mortalidad del mangle y proliferación de especies no deseadas (Atucha, 2009).

La degradación del medio tiene su origen principalmente debido a la falta de conocimiento sobre los valores del área, impactos producidos sobre los recursos, así como de las formas de prevenir o mitigar los daños; por emisiones de humos y gases de la combustión de hidrocarburos, provenientes de las industrias cercanas y ausencia de un sistema de tratamiento de residuales, líquidos y sólidos, lo que provoca la presencia en toda la línea costera, en el ecosistemas de manglar (figura 3), situación que también se refleja en toda la línea costera, y en el ecosistema de manglar con la aparición de diversos productos industriales (tales como hidrocarburos) y desechos producto de la actividad humana (figura 3), este último en menor cuantía, que se solucionaría si existiera en la empresa algún instrumento que regule la disposición final de estos residuales.

### **Evaluación de impacto ambiental mediante el análisis de las matrices**

La identificación de los impactos ambientales se obtuvo analizando la interacción entre los componentes provenientes de las empresas asentadas en el Puerto Moa y los factores ambientales de su medio circundante. Se identificaron los factores afectados del medio y las acciones que generan impactos con la ejecución del proyecto.

En la EIA en condiciones actuales de operación, la matriz causa – efecto (tabla 4) presenta dos entradas con 7 atributos ambientales a impactar y 4 actividades que pueden causar impacto en el ambiente y la salud. Analizando las 28 posibles interacciones obtenidas en la matriz causa – efecto, se encontró que se relacionan 24 atributos con sus respectivas actividades impactantes. Se identificó que la calidad del aire está determinada por las actividades: emisión de contaminantes y



**Figura 3.** Imágenes de zonas impactadas con hidrocarburos del petróleo provenientes de las empresas asentadas en el puerto. Manglar (A), Marisma (B).

la acumulación de residuos. A su vez las aguas superficiales y subterráneas están influenciadas por el vertido de aguas residuales producto de las actividades humanas, vertido de aguas y líquidos industriales, emisión de contaminantes y acumulación de residuos.

Los factores suelo y vegetación están afectados por todas las acciones impactantes excepto por el vertido de aguas residuales producto de las actividades humanas. Tanto fauna, relaciones ecológicas y salud e higiene se cruzan en la matriz con todas las acciones impactantes (tabla 4).

En un segundo paso se elaboró la matriz de valoración de impactos, la que permitió obtener una valoración cualitativa de la importancia de los impactos presentes, interceptando las dos informaciones, obtenidas sobre la base de la matriz causa – efecto, con la finalidad de significar cuáles alteraciones ambientales se derivan tanto del estado inicial del medio, durante la ejecución del proyecto, como durante su explotación; permitiendo entonces valorar su importancia.

En la matriz de valoración de impactos (tabla 5) se muestran 24 impactos negativos, resultado del análisis del cruce de datos de la matriz causa-efecto contra las 11 características correspondiente a la matriz en cuestión, lo cual significa que, además de ser perjudiciales, disminuyen la calidad de los factores analizados. Por tanto se muestran tres resultados irrelevantes por debajo de 25, valor establecido en la metodología se-

gún Conesa (2000) y Milán (2004); correspondientes a M2I1, M5I1, M6I1 para un 13 % del total (García et al., 2013). En el caso de los resultados moderados se exhiben 16 valores entre 25 y 50, que corresponden al 67 % del total y los resultados severos entre 50 y 75 muestran un total de 5 atributos impactados correspondiente a M1I4, M2I3, M2I4, M5I3, M6I3 y consideran el 21 %.

Según se muestra en la tabla 5, en el factor calidad del aire, el impacto de la emisión de contaminantes resultó ser moderado, determinado fundamentalmente por los atributos intensidad, momento, efecto y probabilidad; sin embargo para este mismo factor, el impacto acumulación de residuos, resultó ser severo determinado principalmente por todos los atributos excepto reversibilidad y periodicidad que presentaron valores de 2, siendo de 12 el valor más elevado para el atributo intensidad. El factor aguas superficiales y subterráneas resultó ser irrelevante para el efecto vertido de aguas de origen humano y moderado para vertido de aguas y líquidos industriales, originándose efecto severo para los impactos emisión de contaminantes y acumulación de residuos, respectivamente, donde los atributos de mayor influencia fueron la intensidad, extensión y el momento (tabla 2).

En cambio, el factor suelo en todos los casos analizados resultó ser moderado en relación con los impactos, sin alguna diferencia significativa entre ellos, donde los

**Tabla 4.** Resultados de la matriz causa – efecto. Etapa: Actual Funcionamiento.

Matriz Causa - Efecto					
Factores del medio	Clave	Etapa: Actual funcionamiento			
		Vertido de aguas residuales. Actividad Humana	Vertido aguas industriales	Emisión contaminante	Acumulación residuos
		I1	I2	I3	I4
Calidad del aire	M1			x	x
Aguas superficiales y subterráneas	M2	x	x	x	x
Suelo	M3		x	x	x
Vegetación	M4		x	x	x
Fauna	M5	x	x	x	x
Relaciones ecológicas	M6	x	x	x	x
Salud e higiene	M7	x	x	x	x

atributos de mayor influencia fueron la intensidad, extensión, momento y efecto. Lo mismo ocurre con los resultados mostrados por el factor vegetación, donde los efectos de los impactos también son moderados (tabla 5).

En el caso particular de los factores fauna, relaciones ecológicas, salud e higiene, están afectados por cada uno de los impactos identificados pero muestran diferencias y algunas significativas en cuanto al grado de importancia del efecto. Ejemplo de esto lo muestra el factor fauna con respecto a la emisión de contaminantes con un efecto severo comparado con los demás impactos que son moderados y uno de ellos con valor irrelevante, donde los atributos que más inciden en el caso del mayor valor (severo) son intensidad, extensión, momento, reversibilidad, acumulación y probabilidad. Así mismo sucede con el factor relaciones ecológicas el cual exhibe un impacto de efecto severo y la influencia de atributos como la extensión, momento, reversibilidad, acumulación e importancia, también muestran un efecto irrelevante y dos de efecto moderado (tabla 5).

Para el factor salud e higiene resulta interesante destacar que todos los impactos que operan tienen un efecto moderado, pero cercano al límite de un efecto severo, es decir, que este es un factor susceptible a cualquier variación de efectos negativos, donde se muestran atributos con gran frecuencia de aparición como la extensión, momento y reversibilidad.

Del análisis de las matrices causa y efecto y valoración de los impactos (tablas 4 y 5) se deriva que los impactos que afectan y los factores del medio dañados se recogen por igual en la matriz de importancia de impacto, esta última revela que los factores del medio que experimentan un alto grado de afectación son principalmente dos, primeramente el factor del medio: aguas superficiales y subterráneas con un valor de alteración de 169, donde el máximo valor de alteración fue 400 y grado de alteración de -42, siendo el más afectado; cabe destacar que el impacto I4 (acumulación de residuos) tiene mayor influencia sobre este factor con un valor de -55 de importancia. El segundo factor del medio que mostró altos índices de afectación fue salud e higiene con un valor de alteración de 165, correspondido con el máximo valor de alteración de 400 y un grado de alteración de -41 donde nuevamente el impacto I4 con I2 (vertido de aguas industriales) ejerce una influencia negativa de -48 de importancia.

A su vez, la matriz de importancia (tabla 6), muestra también dos impactos ambientales con altos valores de alteración. El impacto I3 identificado como emisión de contaminante, muestra un valor de alteración de 314, correspondido por el consiguiente máximo valor de alteración de 700 y un grado de alteración de -45. El impacto I4 identificado como la acumulación de residuos, muestra el valor más elevado de alteración que el mismo puede manifestar hacia los factores del medio, llegando a alcanzar el valor de 322, correspondido por su máximo valor de alteración también de 700 y un grado de alteración de -46.



**Tabla 5.** Resultados de la matriz de valoración de impactos. Etapa de Actual Funcionamiento.

Impactos	ETAPA: Actual funcionamiento											Valor Máximo de Importancia	
	Naturaleza	Intensidad	Extensión	Momento	Persistencia	Reversibilidad	Acumulación	Probabilidad	Efecto	Periodicidad	Percepción Social		
	Signo	In	Ex	Mo	Pr	Rv	Ac	Pb	Ef	Pr	PS	I	
M1I3	-	2	2	4	2	1	1	4	4	2	1	-29	100
M1I4	-	12	4	4	4	2	4	4	4	4	2	-72	100
M2I1	-	2	2	1	1	1	1	2	1	1	0	-18	100
M2I2	-	4	4	4	4	2	4	4	1	2	1	-42	100
M2I3	-	8	4	4	4	2	4	1	4	1	2	-54	100
M2I4	-	8	2	4	4	2	4	4	4	4	1	-55	100
M3I2	-	2	2	4	4	2	4	4	4	2	0	-34	100
M3I3	-	4	4	4	4	2	4	1	4	1	0	-40	100
M3I4	-	4	2	2	4	1	4	1	4	2	0	-34	100
M4I2	-	4	2	4	4	2	4	1	4	2	0	-37	100
M4I3	-	4	4	4	4	2	2	1	4	1	0	-38	100
M4I4	-	2	2	2	2	1	4	1	4	1	0	-25	100
M5I1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-12	100
M5I2	-	4	2	2	2	1	4	1	4	1	0	-31	100
M5I3	-	8	4	4	4	2	4	4	4	2	1	-57	100
M5I4	-	4	4	4	4	2	4	4	4	2	0	-44	100
M6I1	-	2	1	2	1	1	4	1	4	1	0	-22	100
M6I2	-	4	2	1	1	1	2	1	4	1	0	-27	100
M6I3	-	8	4	4	4	2	4	4	4	2	0	-56	100
M6I4	-	4	4	4	4	2	4	4	4	2	0	-44	100
M7I1	-	4	1	1	2	1	4	1	4	1	1	-29	100
M7I2	-	4	4	4	4	2	4	4	4	4	2	-48	100
M7I3	-	2	4	2	4	2	4	4	4	4	2	-40	100
M7I4	-	4	4	4	4	2	4	4	4	4	2	-48	100
<b>Total</b>		<b>105</b>	<b>69</b>	<b>74</b>	<b>76</b>	<b>39</b>	<b>83</b>	<b>61</b>	<b>87</b>	<b>48</b>	<b>15</b>	<b>936</b>	<b>2400</b>

**Tabla 6.** Resultados de matriz de Importancia de impactos. Etapa de Actual Funcionamiento.

Factores del medio		Etapa: Actual funcionamiento						
		Impactos				Valor Alteración	Máx. valor de alteración	Grado de Alteración
Nombre	Clave	I1	I2	I3	I4			
Calidad del aire	M1			-29	-72	-101	200	-51
Aguas superficiales y subterráneas	M2	-18	-42	-54	-55	-169	400	-42
Suelo	M3		-34	-40	-34	-108	300	-36
Vegetación	M4		-37	-38	-25	-100	300	-33
Fauna	M5	-12	-31	-57	-44	-144	400	-36
Relaciones ecológicas	M6	-22	-27	-56	-44	-149	400	-37
Salud e Higiene	M7	-29	-48	-40	-48	-165	400	-41
Valor Medio de importancia		-39						
Dispersión Típica		14						
Rango de Discriminación		-25		-53				
Valor de la Alteración		-81	-219	-314	-322	-936		
Máximo Valor de Alteración		400	600	700	700		2400	
Grado de Alteración		-20	-37	-45	-46			-39

### Resultados del método Delphi para validar la investigación

En múltiples ocasiones las técnicas matemáticas y estadísticas no son capaces de revelar la esencia de los objetos y fenómenos que se estudian, debido a que son multivariadas y muy complejas. En este sentido se han elaborado métodos, que a partir de la experiencia y conocimientos de un grupo de personas considerados expertos en la temática que se está abordando, de manera puedan ofrecer valoraciones conclusivas de un problema en cuestión y hacer recomendaciones respecto a sus momentos fundamentales con un máximo de competencia.

El análisis del impacto que genera el manejo de hidrocarburos y otros insumos en las empresas asentadas en Puerto Moa, fue realizado por el grupo de expertos; para lo cual se realizaron encuestas que permitieron obtener criterios cualitativos en una primera ronda y cuantitativos en las rondas dos y tres, lo que permitió alcanzar una unidad de criterios acerca de las variables que mayor incidencia tienen en la elección del tipo de rehabilitación, cumpliendo con el diagrama establecido para este tipo de análisis (figura 2).

En la primera ronda de pregunta abierta, se analizaron y aceptaron las 8 variables sugeridas que permitieron tener

una valoración sobre la preparación de los expertos para acometer este tipo de estudio. Esta abordó un cuestionario que demuestra la preparación de los expertos en cuanto a criterio de estudios de impacto ambiental, experiencia y profundidad en la temática, así como los métodos existentes, las principales tareas y el conocimiento de la existencia o no de metodologías que permitan un adecuado estudio de evaluación de impacto ambiental, concluyendo con un informe de la valoración de los impactos con propuestas de medidas que garantizan la mitigación de los impactos detectados.

Los resultados de las encuestas demostraron estabilidad de opiniones de los expertos. Las 8 variables fueron aceptadas y pasaron a la próxima ronda.

La segunda fase permitió determinar la frecuencia relativa y la aceptabilidad promedio lo cual condujo a seleccionar las variables finales. Se trabajó con una repetición de 7, empleando el valor de Kcomp de cada experto, lo que permitió ponderar las frecuencias a partir de la evaluación de todos los expertos de la ronda anterior. No se despreció ninguna puntuación ya que el valor más bajo de frecuencia relativa fue de 7,6 con respecto a la máxima calificación de 10 obtenidas de las 8 variables, con una aceptabilidad promedio de excelente.

En la tercera ronda se sometieron a valoración las 8 variables definidas con anterioridad y como criterio de selección se tomó una escala de 3,000-9,000 en orden decreciente, correspondiendo con 3,000 a la menor incidencia y 9,000 a la mayor.

Con las evaluaciones obtenidas se determinó el grado de concordancia entre expertos, a través del coeficiente de Kendall (Ken), cuyo valor oscila entre 0 y 1, se considera que cuando  $Ken > 0,7$  existe elevada concordancia entre los expertos y cuando  $Ken < 0,4$  no existe concordancia (Linstone y Turoff, 2002).

Como resultado, en la selección de las principales variables que inciden en la valoración del criterio de los expertos, se obtuvo que el valor del coeficiente Kendall es 0,95; confirmando que existe concordancia en el criterio de los expertos.

## Conclusiones

La metodología de análisis de datos a través del grupo de expertos muestra una concordancia positiva en relación a los resultados emitidos para su validación, de ahí que los factores del medio analizados, el factor suelo y el humano (Salud e higiene) son los más vulnerables a la actividad socioeconómica que se realiza en el área de estudio, ellos evidencian una exposición elevada a los hidrocarburos y residuos de origen industrial, atendiendo a que no existe un sistema de tratamiento, la ausencia de políticas, instrumentos de gestión ambiental, labores de buenas prácticas que tracen un camino hacia el correcto manejo y relación con los factores del medio existentes. Los resultados arrojados por la matriz de importancia de impactos para los factores antes mencionados exhibieron valores significativos de importancia con respecto a los demás factores del medio y de gran vulnerabilidad frente a los impactos identificados. El estudio sugiere elaborar una carpeta de proyectos destinados al mejoramiento e instrumentar una adecuada gestión ambiental para la empresa Puerto Moa, además de caracterizar el suelo contaminado con hidrocarburo para su posible mejoramiento por medio de tecnologías de tratamiento biotecnológico.

## Referencias

- Atucha, M. (2009). Acciones para elevar la cultura ambiental en la comunidad del Puerto de Guayabal. Auditoría Ambiental a Puerto Moa. CESIGMA, p 48.
- Barker, A. y Wood, C. (1999). An evaluation of EIA system performance in eight EU countries. *Environmental Impact Assessment Review*, 19, 387-404.
- CICA (Centro de Inspección y Control Ambiental). (2001). Guía para la realización de las solicitudes de licencia ambiental y los estudios de impacto ambiental. La Habana, p 56.
- CITMA. (2009). Estrategia nacional de educación ambiental, 2010-2015, CUBA. La Habana, p 27.
- Conesa, V. (2000). Guía metodológica para la evaluación del impacto ambiental. Tercera Edición. Mundi-Prensa. España. 1-30.
- García, C., Guilarte, A., Fernández, O., Comas, Y. (2013). Impacto sociocultural de la situación medioambiental en la empresa Puerto Moa. Tesis en Opción al Título de Licenciada en estudios socioculturales, Instituto Superior Minero Metalúrgico, Moa-Holguín, p. 42.
- García-Cuellar, J. A., Arreguin-Sánchez, F., Hernández, S y LLuch-Cota, D. (2004). Impacto económico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29(6), 311-319.
- Guédez, C., De Armas, D., Reyes, R., Galván, L. (2003). Los sistemas de gestión ambiental en la industria petrolera internacional. *Interciencia*, 28(9), 528-533.
- Linstone, A and Murray, T. (2002). The Delphi methods techniques and application. *University of Southern California Edition, EUA*, p. 615.
- Milán, J.A. (2004). Curso de estudio y evaluación de impacto ambiental. Editorial Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Nicaragua, p. 375.
- Nápoles, J., Marañón, A., Cumbá, F., Anllo, Y.; Abalos, A. (2005). Tratabilidad de suelos contaminados aplicando microcosmos. *Revista Cubana de Química*, 17(1), 179-188.
- Oñate, N., Ramos, L. y Díaz, A. (1998). Utilización del Método Delphi en la pronosticación: Una experiencia inicial. Cuba: *Economía Planificada*, 3 (4), 9-48.
- Orozco, C., Pérez, A., González, M. N., Rodríguez, F., Alfayate, J. M. (2004). Contaminación ambiental: una visión desde la química. Primera edición. Thomson. Madrid. España, pp. 453-450.
- Ramakrishna, D. y Viraraghavan, T. (2005). Environmental impact of chemical deicers- a review. *Water, Air and Soil Pollution*, 166(1),49-63.
- Viñas, M., Sabaté, J., Grifoll, M., Solanas, M. (2001). Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. *Residuos. Revista Técnica*, 59, 78 - 82
- Wilkins, H. (2003). The need for subjectivity in EIA: discourse as a tool for sustainable development. *Environmental Impact Assessment Review*, 23, 401-404.

# Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas

## Isolation and characterization of strains of *Bacillus* spp. With activity against *Tetranychus urticae* Koch in commercial crops of roses

Isabel Larrea Izurieta\*, Carlos Falconí Borja\*\*, Andrea Arcos Andrade\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291

### Resumen

Una de las especies de ácaros que producen considerables pérdidas cualitativas y cuantitativas en el cultivo de rosas bajo invernadero en Ecuador es *Tetranychus urticae*, donde el control con agroquímicos convencionales no es efectivo; por lo cual se busca identificar cepas de *Bacillus* spp. aisladas a partir de *T. urticae* y determinar sus escenarios anatómicos patogénicos para un futuro control con bacterias. La fase de campo se realizó en la florícola Naranjo Roses S.A. en Latacunga en un cultivo de rosas bajo condiciones orgánicas, en donde se recolectaron hojas de cada tercio de seis plantas con presencia de *T. urticae* Koch. Las muestras fueron trasladadas para ser procesadas en Plantsphere Laboratories (PSL) en Quito. Se identificaron y cuantificaron los diferentes estadios de la plaga y se aislaron algunos individuos para determinar la presencia de cepas patogénicas de *Bacillus* spp., las cuales fueron aisladas, purificadas e identificadas. Los tratamientos de verificación patogénica fueron las cepas, agua destilada (testigo) y *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* (testigo positivo). Los eventos patogénicos se evaluaron en hembras adultas de *T. urticae* mediante citohistoquímica, por medio de la cual se reportó ruptura de paredes externas, precipitación de contenido celular y malformaciones cuticulares. Se determinó que el mayor número de individuos plaga se localizan en el tercio bajo (59,4%) con mayor presencia de huevos (63,3%). Mediante análisis de componentes principales (ACP) de los tratamientos, se determinó las cepas más eficientes como Efectores Biocatalíticos (EBc®) siendo estas la PSL 104, 113, 114 y *Bacillus thuringiensis* biovar *acari*.

**Palabras clave:** citohistoquímica, Efectores Biocatalíticos (EBc®), foco de infección, control biológico, agrosistemas.

### Abstract

One of the species of mites that cause considerable qualitative and quantitative losses in roses growing under greenhouses in Ecuador is *Tetranychus urticae*, where conventional agrochemicals control is not effective; therefore seeks to identify strains of *Bacillus* spp. Isolated from *T. urticae* and determine their anatomical pathogenic scenarios for future control with bacteria. The field phase took place in Naranjo Roses S.A. in Latacunga in a growing roses under organic conditions, where they were collected sheets of each third of six plants with presence of *T. urticae* Koch. The samples were taken to be processed in Plantsphere Laboratories (PSL) in Quito. They were identified and quantified the different stages of the pest and some individuals were isolated for the presence of pathogenic strains of *Bacillus* spp., which were isolated, purified and identified. Check treatments of pathogenic were strains, distilled water (control) and *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* (positive control). Pathogenic events were evaluated in adult females of *T. urticae* by citohistochemistry, where breakout of the outer walls, precipitation of cell contents and cuticular malformations were reported. It was determined that the largest numbers of pest individuals are located in the lower third (59.4%) with greater presence of eggs (63.3%). Using principal component analysis (PCA) of the treatments, the PSL 104, 113, 114 and *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* was determined as the most efficient Biocatalytic Effectors (EBc®).

**Key words:** citohistochemistry, Biocatalytic Effectors (EBc®), source of infection, biological control, agrosystems.

**Recibido:** enero 24 de 2015

**Aprobado:** octubre 30 de 2015

\* Agrobiotecnóloga, Escuela de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas de la Salud y la Vida, Universidad Internacional del Ecuador, Collacoto - Quito, Ecuador; y Responsable de laboratorio, Plantsphere Laboratories, Bellavista de Carretas - Quito, Ecuador marisa.larrea@hotmail.com

\*\* Doctor en Ciencias Naturales, Gerente General, Plantsphere Laboratories, Bellavista de Carretas - Quito, Ecuador drfalconi-labs@biosftware.de

\*\*\* Ingeniera Biotecnóloga, Docente Escuela de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas de la Salud y la Vida, Universidad Internacional del Ecuador, Collacoto - Quito, Ecuador aarcos.47@gmail.com



## Introducción

Existen aproximadamente 1500 microorganismos que poseen propiedades insecticidas, nematocidas, etc. (Niedmann y Meza, 2006). *Bacillus* spp., es considerado como el principal agente de control biológico o Efector Biocatalítico (EBc®), patógeno de invertebrados versátil por sus mecanismos de acción (Flores et al., 2011 y Falconí, 2013a). Este tipo de bacterias son localizadas fácilmente en el suelo, aire, agua, plantas, etc. (Veitía et al., 2003; Layton et al., 2011). Dichos microorganismos son considerados EBc® ya que actúan por medio de diversos procesos y mecanismos, en la regulación de sistemas individuales o colectivos que evidencian alteración o desequilibrio (Falconí, 2014a).

Según Expoflores (2013) *Tetranychus urticae* es un ácaro polífago conocido comúnmente como araña roja, en la antigüedad no era considerada una plaga de importancia económica, por la presencia de enemigos naturales los cuales mantenían el equilibrio de dicha plaga; debido al uso indiscriminado de pesticidas desde la segunda guerra mundial, dicho equilibrio empezó a desaparecer. Cerna et al. Dice que actualmente se la considera una de las especies que ocasiona mayor perjuicio en la agricultura a nivel mundial. En rosas es el más abundante causando oscurecimiento y debilitamiento en la producción de botones, en sí pérdida en la calidad de la flor, siendo en el cultivo de rosas en el Ecuador un problema recalcitrante (Rojas et al., 2011; Yáñez et al., 2014).

Mediante diferentes técnicas de laboratorio se puede identificar microorganismos, por ejemplo la aplicación de tinción de Gram (Gómez, s/a) y pruebas bioquímicas que permiten determinar la localización taxonómica de microorganismos por su comportamiento metabólico (García y Silva, 2004). Mientras que, la citohistoquímica es un proceso que produce reacciones de contraste que se traducen en matices de coloración patogénica en componentes celulares y tejidos, permitiendo así identificar mediante microscopio las áreas afectadas de una muestra (Rodak, 2005; Falconí, 2014b).

Debido a que los agroquímicos convencionales para el control de ácaros no son eficientes, en este estudio se busca aislar e identificar cepas de *Bacillus* spp. a partir de *T. urticae* y evaluar sus eventos de patogenicidad en comparación a un testigo y *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* como testigo positivo, el cual ha mostrado ser eficiente en condiciones de campo (Lozada, 2011), como potenciales Efectores Biocatalíticos (EBc®) de *T. urticae*.

## Materiales y métodos

### Área de estudio

La toma de muestras se realizó en la florícola Naranjo Roses S.A. ubicada a 0°59'46.44" de latitud sur y a 78°36'23.52" de longitud oeste en Latacunga pro-

vincia de Cotopaxi, se identificó el bloque de rosas tipo orgánico con mayor presencia de *T. urticae* y en el que no fue aplicado ningún tipo de acaricida. La fase de laboratorio se realizó en Plantsphere Laboratories (PSL) en Quito, provincia de Pichincha, donde se procesaron las diferentes muestras de hojas de rosas con presencia de *T. urticae*.

### Muestreo

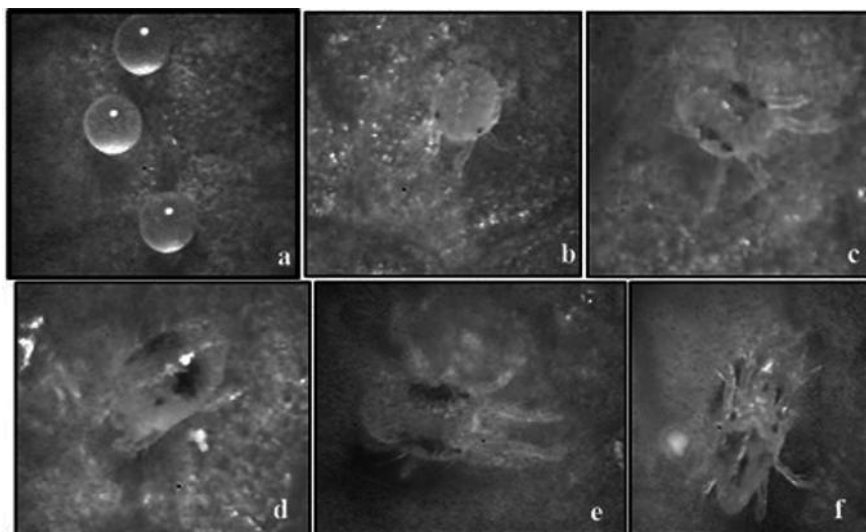
En el invernadero de rosas variedad *Freedom*, se localizaron tres focos de infección (plantas infectadas) con presencia de *T. urticae* y en cada uno de estos se colectaron 15 hojas de cada tercio (superior, medio y bajo). Se realizaron dos muestreos con una diferencia de 15 días. Las hojas colectadas fueron colocadas en fundas plásticas sin evacuar el aire, procurando formar volúmenes físicos de aire para afectar lo menos posible la integridad de las muestras biológicas, estas fueron cerradas y debidamente etiquetadas para ser transportadas al laboratorio (Adaptado de Falconí, 2013b).

### Cuantificación e identificación de poblaciones de *T. urticae*

La metodología utilizada fue adaptada de Falconí (2013b). Se utilizaron cajas plásticas con tapa (6x28x18cm), cuidadosamente desinfectadas con alcohol (70%), en la base de estas se localizó papel filtro con las dimensiones de la base de la cámara, humedecido con agua destilada estéril. En cada cámara se colocaron las hojas de rosas recolectadas, direccionadas con el envés hacia abajo. Las cámaras fueron ubicadas en un lugar claro, no expuestas directamente al sol, simulando las condiciones naturales respecto a la luz en las que se localiza la plaga en campo; cada caja debidamente etiquetada con el código referente al foco de infección, tercio al que pertenecen y la fecha de recolección. Con un microscopio, a 20X y 40X se observaron cada una de las hojas, procediendo a identificar y cuantificar los diferentes estadios de los ácaros (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa, hembra y macho) (figura 1).

A medida que se realizaba el conteo se consideró la presencia de posibles patógenos que se podían evidenciar en los ácaros, los cuales se manifestaban en forma de necrosis, tumoraciones, lisis, precipitación de fluidos, disolución de tejido.

Se prepararon 18 cajas Petri (para los dos muestreos) con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), como medio básico, en los cuales se colocaron 20 ácaros debidamente distribuidos, se utilizó una caja Petri por cada cámara húmeda. Durante el periodo de incubación en las cámaras húmedas en ciclos de 24 horas, se consideró que si un individuo presentaba algún tipo de patología debidamente verificado mediante la observación a 20X y 40X, este era aislado y colocado directamente en PDA. Debido a que no todos los in-



**Figura 1.** Diferentes estadios de *T. urticae*. a) huevo, b) larva, c) protoninfa, d) deutoninfa, e) adulto hembra, f) adulto macho, usado en el estudio.

dividuos manifestaban algún tipo de patología, se aislaron respectivamente al azar cuatro huevos, cuatro larvas, cuatro protoninfas, cuatro deutoninfas y cuatro adultos (hembras y machos), por cada uno de los tercios. Cada caja Petri fue etiquetada con el código y la fecha de aislamiento, además en la base se escribió un código para saber el estadio: H (Huevo), L (Larva), P (Protoninfa), D (Deutoninfa), A (Hembra), M (Macho). Las cajas Petri fueron incubadas a 28°C, fueron observadas a diario durante tres días para identificar algún microorganismo con características de *Bacillus*.

#### **Aislamiento e identificación de *Bacillus* spp.**

Las cepas bacterianas fueron identificadas como “típicas de *Bacillus*” cuando poseían bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, brillante, aspecto harinoso, ceroso, seco o cremoso. Simultáneamente eran aisladas en una nueva caja Petri con PDA para su purificación, además fueron debidamente etiquetadas con números y códigos PSL, se incubaron a 28°C y se observó a diario durante un periodo de cinco días para determinar que no hubiese contaminación. Posteriormente se realizó tinción de Gram para determinar bacterias Gram+ utilizando la metodología de Carrea (2009) y 4 pruebas bioquímicas:

- a. Prueba de la catalasa, adaptado de Zapata (2012)
  - Cada cepa fue sembrada por estría cruzada en medio de cultivo Agar Nutritivo, se incubó a 28°C por 24 horas.
  - Por cada cepa se colocó en un portaobjetos codificado tres gotas de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
  - Con un palillo se tomó un poco de la colonia y se colocó en la primera gota, lo mismo se rea-

lizó para las dos gotas restantes con diferentes palillos, teniendo así tres repeticiones para comprobar la reacción.

- La prueba fue positiva una vez que se observó la formación de burbujas debido a la producción de O<sub>2</sub> por la actividad enzimática.
- b. Prueba en Agar Hierro Triple Azúcar (Cuervo, 2010)
- c. Voges Proskauer (Aquihuatl et al., 2012)
- d. Prueba de la hidrólisis del almidón (Carrera, 2009)

#### **Patogenicidad**

Para el desarrollo de esta fase, se adaptó la metodología de Falconí (2014b).

#### **Cosecha de cepas de *Bacillus* spp.**

Bajo condiciones de asepsia usando la cámara de flujo laminar, cada una de las cepas identificadas como *Bacillus* spp., se sembraron en PDA por inoculación masiva incubándolas a 28 °C durante cuatro días. En botellas de vidrio de 300ml, se prepararon 100ml de Buffer fosfato con tween 80 (10ul) estériles. El PDA en el que creció cada una de las cepas fue cortado en cuadrados pequeños de aproximadamente 2 x 2 cm con ayuda de un bisturí flameado y colocados individualmente en las botellas con buffer, se agitó en el vórtex y posteriormente se filtraron, obteniendo así una solución base de cada una de las cepas.

#### **Selección de Efectores Biocatalíticos®**

La primera selección de los Efectores Biocatalíticos® fueron realizadas en cámaras húmedas (cajas Petri) en donde se colocó una hoja de rosa variedad Freedom

la cual presentaba *T. urticae*. Se realizó tres cámaras húmedas (repeticiones) por cada una de las 15 cepas, más el testigo (agua destilada) y el tratamiento positivo con *Bacillus thuringiensis* biovar *acari*. La evaluación se la realizó mediante la observación a 20X y 40X contabilizando el número de individuos y estadíos para proceder a la inoculación de cepas bacterianas aisladas y caracterizadas genéricamente. En tubos de ensayo se colocó 1ml de la solución bacteriana y con ayuda de un aspersor se procedió a impregnar de bacterias dos veces tanto en el haz como el envés de la hoja. Constantemente se controló que las cámaras húmedas conserven el 50% de humedad. Después de 8 días se observó en el microscopio (20X – 40X) si los individuos presentaban o no algún tipo de anomalía patológica, originados por efecto de la actividad metabólica de una o más sustancias involucradas en procesos de mortalidad de la plaga (Falconí, 2013b).

### Citohistoquímica

Las hojas infectadas se colocaron en un porta objetos sanitizado con alcohol al 98% y luego tratadas con tres gotas del reactivo de citohistoquímica PSL-CHQ 127, se dejó reposar a temperatura ambiente durante tres minutos, posteriormente a 20X y 40X se observaron los individuos de *T. urticae*. Donde en cada uno de los tratamientos se identificaron tres hembras, una por cada gota y evaluadas al microscopio (1000X). En cada una de las muestras se procuró determinar alguna alteración en la morfología externa de cada individuo, como por ejemplo disolución de paredes celulares, tejidos dañados, necrosis, etc. determinando así que áreas se encontraban más afectadas por las cepas de *Bacillus* spp., comparándose con las placas testigo. Las evidencias de patogenicidad se verifican con técnicas

de citohistoquímica las cuales tiene como propósito visualizar tejidos, sistemas, órganos afectados por mecanismos de control bacteriano (Falconí, 2013b).

### Análisis de datos

Para determinar si las diferencias entre las medias poblacionales de los grupos (superior (Ts), medio (Tm) y bajo (Tb)) son significativas o no (95% de confiabilidad), se utilizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para la comparación múltiple entre las medias (95% de confiabilidad). Los datos fueron procesados empleando el paquete estadístico IBM® SPSS STATISTICS 22.0. Se determinó el análisis porcentual para determinar el número de individuos en cada tercio (superior (Ts), medio (Tm) y bajo (Tb)). Dentro de ese mismo esquema se determinó la cantidad promedio de individuos por estadio, que se presentaba en cada uno de los tercios en los focos de infección.

Se determinó el número de colonias con características de *Bacillus* spp. presentes en los diferentes individuos de *T. urticae* aislados a partir de hojas de rosas de los diferentes tercios. La tinción de Gram y pruebas bioquímicas se determinaron mediante la reacción positiva y negativa determinándose así el porcentaje de las cepas que produjeron una reacción positiva.

Se realizó un Análisis de Componente Principales (PCA) como método de síntesis y ordenación de los tratamientos que produjeron un mismo tipo o similar tipo de afección patológica en hembras adultas de *T. urticae*. Para esto se utilizó el programa estadístico mencionado anteriormente (IBM® SPSS STATISTICS 22.0).

**Tabla 1.** ANOVA (Analysis of variance) entre tercios (superior (Ts), medio (Tm), bajo (Tb)) según el número de individuos.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9540318,111	2	4770159,056	46,265	,000
Dentro de grupos	1546578,167	15	103105,211		
Total	11086896,278	17			

**Tabla 2.** Individuos de *T. urticae* distribuidos por tercio en cada uno de los focos de infección de los dos muestreos.

Tercio	Foco de infección						Total
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Ts	4,3%	6,1%	12,1%	8,9%	9,0%	15,3%	9,1%
Tm	34,2%	25,9%	36,6%	28,8%	35,1%	30,7%	31,5%
Tb	61,5%	68,0%	51,3%	62,3%	55,8%	54,0%	59,4%

Ts = Tercio superior, Tm = Tercio medio, Tb = Tercio bajo.

## Resultados y discusión

### Número de individuos e identificación de estadios de *T. urticae*.

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos por el ANOVA ( $P=00$ ) donde se comprueba que existe diferencias en el número de individuos entre cada uno de los tercios. En la tabla 2 se muestra que el número de individuos de *T. urticae* disminuye a medida que se alejan del sistema basal, ya que de los 21211 individuos contabilizados en los seis focos de infección, el 59,4% (12606) se encontró en el tercio inferior, lo cual es corroborado por Rojas *et al.* (2011) en donde localizaron una mayor infestación de la plaga en la parte baja de las plantas de rosas por la alta densidad de hojas. Además, se ha determinado que esta es una estrategia

para multiplicarse y protegerse ya que se encuentran más aislados de los factores físicos, químicos del manejo cultural y agronómico del cultivo, lo cual indica que es un mecanismo de sobrevivencia de la plaga, por lo que es importante valorizar la información de los sistemas de control de ácaros (Falconí, 2013b). Estos resultados se obtuvieron en los dos muestreos que fueron realizados con una diferencia de 15 días.

En todos los tercios se encontró huevos (62,6%) de *T. urticae*, observándose que en proporción al desarrollo del individuo hasta llegar al estadio adulto esta va disminuyendo como lo muestra la tabla 3. Esto a causa de que el muestreo fue realizado cuando la temperatura dentro del invernadero fluctuaba entre los 22°C, el óptimo de temperatura es de 25°C para el desarrollo de *T. urticae* y las hembras durante su ciclo de vida (20 a 28 días) ovipositan de 100 a 120 huevos. En tanto que

**Tabla 3.** Porcentaje total de los diferentes estadios de *T. urticae* presentes en cada uno de los tercios.

Estadio	Tercios			Total
	Ts	Tm	Tb	
Huevos	4,6%	23,6%	34,3%	62,6%
Larvas	2,3%	5,0%	13,7%	21,0%
Protoninfas	1,0%	1,2%	8,4%	10,6%
Deutoninfas	0,8%	0,7%	2,6%	4,1%
Adulto H	0,3%	0,5%	0,7%	1,5%
Adulto M	0,1%	0,1%	0,1%	0,2%
Total	9,0%	31,1%	59,9%	100%

H = hembra, M = macho, T = tercio, s = superior, m = medio, b = bajo

**Tabla 4.** Número de colonias con características de *Bacillus* spp. presentes en cada uno de los focos de infección, en los diferentes tercios y estadios

Estadio	Foco de infección																		T.C.P.E.
	F1			F2			F3			F4			F5			F6			
	Ts	Tm	Tlb	Ts	Tm	Tlb	Ts	Tm	Tlb	Ts	Tm	Tlb	Ts	Tm	Tlb	Ts	Tm	Tlb	
H	1	1	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	9
L	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
A	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de colonias en todos los focos de infección y estadios																			16

F1 a F6: Focos de infección, Ts: Tercio superior, Tm: Tercio medio; Tb: tercio bajo; T.C.P.E.: Total de colonias por estadio; H: Huevo; L: Larva; P: Protoninfa; D: Deutoninfa; A: Adulto hembra; M: Adulto macho.



la relación hembras adultas a machos adultos en este estudio es de 6:1, en promedio en diferentes cultivos la relación sexual es de 3:1 (Zhang, 2003).

#### **Presencia de colonias con características de *Bacillus* spp.**

El mayor número de colonias con características de *Bacillus* spp. se encontraron en el estadio de huevo (9), seguido de la presencia en hembras adultas (3), deutoninfas (2) y en un solo individuo en los estadios de larva y de protoninfa, en total se determinaron 16 cepas con características morfológicas de *Bacillus* spp. (tabla 4), con bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, aspecto harinoso, ceroso, seco o cremoso al igual que las cepas de *Bacillus* aisladas a partir de suelo identificadas en el estudio de Carrera (2009) y Lozada (2010) quién aisló *Bacillus subtilis* y *Bacillus sphaericus* a partir de fertilizantes, con las mismas características de identificación morfológica para llegar a género y posteriormente realizaron pruebas bioquímicas para llegar a la especie. Además se demuestra en agrosistemas que la presencia numérica de los reguladores naturales tiene enorme trascendencia en el con-

trol de patógenos durante algunas estaciones de las épocas productivas (Falconí y Mendgen, 1993; Falconí y Blanco, 2001). Además se pudo observar que *Bacillus* se desarrolla en PDA, es así que en el estudio de Zhiqiong et al. (2013) realizan pruebas de antagonismo de *Bacillus* contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, haciendo que tanto la bacteria como el hongo se desarrollen en el medio de cultivo mencionado para realizar sus respectivas evaluaciones; de igual manera Swain y Ray (2006) evaluaron en platos de PDA la inhibición de crecimiento in vitro de hongos colocando cepas de *Bacillus subtilis* aisladas a partir de estiércol de vaca.

#### **Identificación de *Bacillus* spp.**

De las 16 cepas, la PSL 103 fue la única Gram-, por lo que fue descartada para realizar las pruebas bioquímicas (tabla 5), atribuible al aislamiento de una bacteria "tipo pseudomona", las cuales morfológicamente presentan bordes ligeramente irregulares, aspecto mucoso y con características de pigmentos fluorescentes

**Tabla 5.** Reacción positiva y negativa de las cepas de *Bacillus* spp. frente a la tinción de Gram y pruebas bioquímicas

Código cepa	Estadio	TG	PC	HA	Prueba TSI			VP
					FG	FLS	PG	
PSL100	Huevo	+	+	+	+	+	+	+
PSL101	Huevo	+	+	+	+	+	+	+
PSL102	Protoninfa	+	+	+	+	+	+	+
PSL103	Huevo	-						
PSL104	Hembra	+	+	+	+	+	+	+
PSL105	Huevo	+	+	+	+	+	+	+
PSL106	Huevo	+	+	+	+	+	+	+
PSL107	Larva	+	+	+	+	+	+	+
PSL108	Hembra	+	+	+	+	+	+	+
PSL109	Huevo	+	+	+	-	-	+	+
PSL110	Huevo	+	+	+	+	-	+	+
PSL111	Deutoninfa	+	+	+	+	-	+	+
PSL112	Deutoninfa	+	+	+	+	-	+	+
PSL113	Hembra	+	+	+	+	-	-	+
PSL114	Huevo	+	+	+	+	-	+	+
PSL115	Huevo	+	+	+	+	-	+	+
	Porcentaje	94%	100%	100%	93%	53%	93%	100%

TG (Tinción de Gram), PC (Prueba de la catalasa), HA (Hidrólisis de almidón), FG (Fermentación de la glucosa), FLS (Fermentación de la lactosa y/o sacarosa), PG (producción de gas), VP (Voges Proskauer), + (Reacción positiva), - (Reacción negativa).

**Tabla 6.** Extracción de análisis de componentes principales.

Varianza total explicada											
Componente	Autovalores iniciales				Sumas de extracción de cargas al cuadrado				Sumas de rotación de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado		Total	% de varianza	% acumulado		Total	% de varianza	% acumulado
1	2,903	72,572	72,572		2,903	72,572	72,572		1,894	47,346	47,346
2	0,636	15,909	88,481		0,636	15,909	88,481		1,645	41,135	88,481
3	0,363	9,071	97,551								
4	0,098	2,449	100								

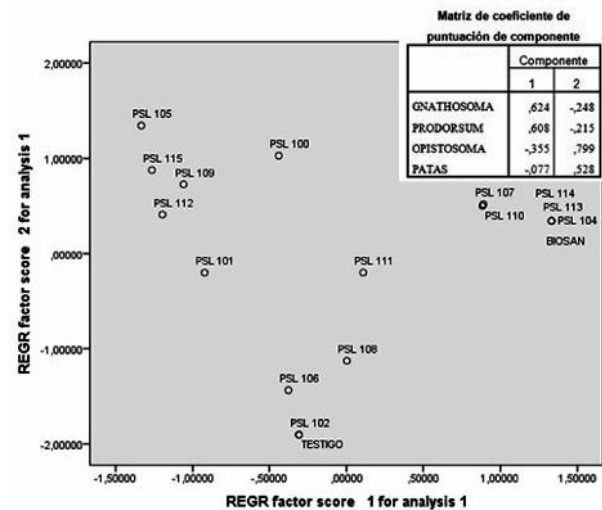
Método de extracción: análisis de componentes principales.

(Todar, 2012), mientras que todas las demás resultaron ser bacterias Gram+. En las pruebas bioquímicas de la catalasa, hidrólisis de almidón y Voges Proskauer todas las cepas dieron positivo. En la fermentación de la glucosa, a excepción de la cepa 109, todas tuvieron una reacción positiva. Las cepas PSL 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107 y 108 fermentan la lactosa y/o sacarosa, mientras que las cepas restantes no lo hacen y casi todas las cepas producen gas, menos la cepa PSL 113.

### Patogenicidad de los diferentes tratamientos

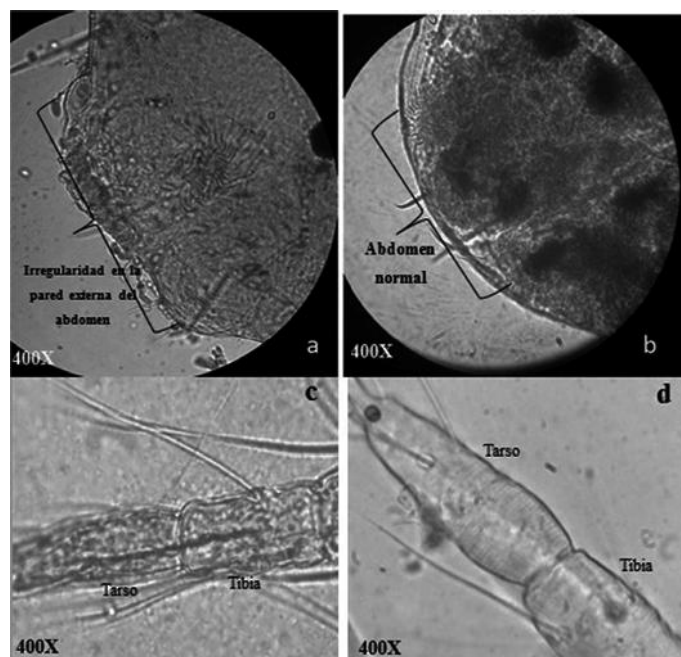
En la tabla 6 se observa que los componentes 1 y 2 son los que mayor porcentaje de varianza acumulan (88,48%), (72,57% y 15,9% respectivamente) y los componentes 3 (9,07%) y 4 (2,45%) no se toman en cuenta para el presente análisis ya que su aporte es muy bajo.

En la figura 2 se observa que los tratamientos se agrupan conforme afectan patológicamente al gnathosoma, prodorsum, opistosoma y/o patas en hembras adultas de *T. urticae*. Podemos observar que los tratamientos PSL 104 (figura 3a), PSL 113, PSL 114 y *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* están estrechamente relacionados afectando a las 4 partes evaluadas (gnathosoma, prodorsum, opistosoma y patas), las cuales pueden ser aplicadas para la trazabilidad en los procesos productivos de manejo integral del cultivo mediante técnicas moleculares (Leibinger, *et al.*, 1997). El ingrediente activo *Bacillus thuringiensis* biovar *acari* por su contenido de sustancias activas tanto bacterias como metabolitos, el efecto de control se produce por bioacumulación originando el colapso de centros nerviosos, digestivos y reproductivos reduciendo drásticamente la actividad biológica de la plaga (Biocontrol Science, 2009), incluso bajo condiciones de campo



**Figura 2.** Análisis de componentes principales (PCA) según la patogenicidad de los diferentes tratamientos en el gnathosoma, prodorsum, opistosoma y patas de hembras de *T. urticae* en los componentes 1 y 2.

(Lozada, 2011). Mientras que PSL 107 (figura 3c) y PSL 110 se diferencian de los tratamientos anteriormente mencionados porque afectan en menor proporción al gnathosoma y prodorsum. Los tratamientos PSL 105, 115, 109, 100 y 112 están relacionados a causa de la patogenicidad en el opistosoma y patas, mientras que las cepas PSL 101, 106 y 108 afectan ligeramente a las patas, PSL 111 afecta altamente a las patas y muy poco al opistosoma y prodorsum. Finalmente los tratamientos PSL 102 y Testigo no presentan ningún tipo de patogenicidad en hembras adultas de *T. urticae*.



**Figura 3.** Citohistoquímica en hembras de *T. urticae* observadas después de 12 días de haber aplicado el tratamiento de inoculación con bacterias. a) Presenta irregularidad en la pared externa del abdomen a causa de la actividad patogénica de la cepa PSL 104. b) Pared externa normal del abdomen. c) Irregularidad en la pared externa de la cutícula y tejido dañado en el tarso y la tibia de la pata III por causa de la cepa PSL 107. d) Pata III sin irregularidades.

### Conclusiones y recomendaciones

El efecto poblacional de *T. urticae* indica que el mayor número de individuos se localiza en el tercio bajo, donde la proporción sexual de *T. urticae* en rosas fue de seis hembras por cada macho, además se localizó una mayor cantidad de huevos (62,6%). Por lo que se recomienda que al momento de hacer la aplicación en campo, el control debe cubrir si es posible toda el área de la planta ya que siempre permanecen individuos que están lejos de ser afectados por los diferentes tipos de control.

El estudio reporta a 15 cepas de *Bacillus* spp. mediante caracterización morfológica y reconfirmación por Tinción de Gram y cuatro pruebas bioquímicas (Prueba de la catalasa, Hidrólisis de almidón, Prueba TSI y Voges Proskauer) en la cuales se obtuvieron resultados positivos para determinar el género *Bacillus*. Se recomienda aplicar la metodología de tinción de endosporas, ya que la presencia de estas es otra de las características fundamentales del género mencionado; existen varias técnicas, el método más empleado es el de Schaeffer Fulton con la utilización de verde malaquita. Además, se recomienda realizar pruebas bioquímicas específicas para determinar la especie de *Bacillus* con la que se está trabajando, o mediante la aplicación de técnicas moleculares.

Debido a que el muestreo fue realizado en una sola época en donde la temperatura fluctuaba entre los 22°C, se recomienda evaluar la presencia de las cepas

bacterianas detectadas en el transcurso de periodos climatológicos extremos caracterizados por condiciones de deltas con afección a plantas y organismos en general.

Mediante la técnica de citohistoquímica se pudo evaluar escenarios anatómicos patogénicos de *Bacillus* spp. causados en hembras de *Tetranychus urticae*, en los cuales se observó ruptura de las paredes externas, precipitación de contenido celular, entre otras, siendo las cepas PSL 104, 113 y 114 las mejores ya que actuaron de igual manera que el tratamientos de control positivo con *Bacillus thuringiensis* biovar *acari*, señalando de esta forma la existencia de reguladores naturales bajo condiciones de alta intensidad agronómica del cultivo de rosas, lo cual demuestra ser eficiente para irrumpir sitios vitales de la plaga, reduciendo el daño que este produce al cultivo. Es importante establecer estudios similares en función de la búsqueda de escenarios de la variabilidad bacteriana del género *Bacillus* para ampliar el espectro de mecanismos y modos de acción destinado al control de importantes plagas agrícolas y en función del ciclo. Se recomienda hacer pruebas en campo de las cepas que se evidenciaron como las más letales en laboratorio y determinar su efectividad en programas de manejo de fincas de flores en control biológico.

Realizar la extracción de ingredientes activos bacterianos de las cepas más eficientes, en tanto que uno de los prin-

cipales componentes en los acaricidas son los metabolitos microbianos de *Bacillus thuringiensis* biovar *acari*.

## Agradecimientos

A Plantsphere Laboratories (PSL) por el apoyo en conocimiento y económico brindado durante toda la investigación y a la florícola Naranjo Roses S.A. por permiternos el acceso a la misma para realizar los muestreos y proporcionarnos la información necesaria.

## Referencias

- Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F. y Salazar, M. (2012). Manual de prácticas de laboratorio microbiología general. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F. pp. 78.
- Biocontrol Science. (2009). Ficha técnica BIOSAN, acaricida - insecticida, ingrediente activo *Bacillus thuringiensis* biovar *acari*. Producto con la garantía del Departamento de Agricultura y Tecnología BIOSOFTWARE (Alemania). Distribuido por Bio-Ciencia (BC) pp. 6.
- Carrera, M. (2009). Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba - Ecuador. pp. 87.
- Cerna, E., Landeros, J., Ochoa, Y., Luna, J., Vázquez, M. y Ventura, O. (2009). Tolerancia de ácaro *Tetranychus urticae* Koch a cuatro acaricidas de diferente grupo toxicológico. *Investigación y Ciencia*. 44, 4-10.
- Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carretera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá - Colombia. pp. 28.
- Expoflores. (2013). Ensayo de una alternativa para el control de ácaros (*Tetranychus urticae*) en rosas en sala de poscosecha. Comisión Técnica Expoflores Flor Ecuador. Recuperado el 18 de junio de 2014, de <http://expofloresflorecuador.blogspot.com/2013/04/ensayo-de-una-alternativa-para-el.html>.
- Falconí, C. y Mendgen, K. (1993). Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*. *J. Plant Dis. Prot.* 101, 38.
- Falconí, C. y Blanco, J. (2001). Reguladores Naturales de plagas Agrícolas. Parasitoides y predadores. CD Multimedia. BIOSOFTWARE (Alemania).
- Falconí, C. (2013a). Fitopatógenos & Efectores BioCatalíticos (EBC®) de cultivos del Ecuador. BIONIKA-Diseño Biocatalítico Inteligente BDKID. Department of Agriculture, Technology and Environment. Ecuador- Germany.
- Falconí, C. (2013b). Protocolo No. 24472. Patología microbiana de ácaros fitopatógenos. Plantsphere Laboratories (PSL)-BIONIKA. Quito - Ecuador. pp. 2.
- Falconí, C. (2014a). Comunicación personal: Efectores Biocatalíticos (EB®). Gerente General Plantsphere Laboratories (PSL). Quito-Ecuador.
- Falconí-Borja, C. (2014b). Protocolo No. 24482. Protocolo de inoculación de *Bacillus thuringiensis* var. *Aracni* en *Tetranychus urticae*. Plantsphere Laboratories (PSL)-BIONIKA. Quito - Ecuador. pp. 4.
- Flores, A., Egúisquiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D., Jesús, Y. y Patiño, A. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. Facultad de Farmacia y Bioquímica. *Ciencia e Investigación*. Chile. 14(1), 29-34.
- García, M. y Silva, M. (2004). Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos. Identificación bioquímica y tipado microbiológico. Unidad didáctica 55. pp. 346.
- Gómez, R. s/a. Laboratorio 4: Tinción de microorganismos. Recinto Universitario de Mayaguez. Universidad de Puerto Rico. Recuperado el 5 de mayo de 2014, de <http://academic.uprm.edu/~lrios/3725/Ejercicio4.pdf>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. y Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp., perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá - Colombia. pp. 177-187.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. y Mendgen, K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87,1103-1110.
- Lozada, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. - Colombia. pp. 35.
- Lozada, A. (2011). Evaluación de productos orgánicos para el control de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*). Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato. Ambato - Ecuador. pp. 101.
- Niedmann, L. y Meza, L. (2006). Evaluation of native strains of *Bacillus thuringiensis* as an alternative of integrated management of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) in Chile. *Agricultura técnica*. Chile. 66(3), 235-246.
- Rodak, F. (2005). Hematología, Fundamentos y aplicaciones clínicas. Capítulo 28. 2da edición. Editorial Médica Panamericana.
- Rojas, F., Torres, P., Rodríguez, D. y Cantor, F. (2011). Efecto de tres densidades de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) sobre el crecimiento de plantas de rosa. Ingeniería Agroecológica. UNIMINUTO.
- Swain, M. y Ray, R. (2006). Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, 164 (2009),121-130.
- Todar, K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Wisconsin - Estados Unidos. Recuperado el 27 de septiembre de 2014, de <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>.
- Veitía, M., Feitó, E., Benítez, M., García, V. y Izquierdo, D. (2003). Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* en el control del ácaro del vaneado del bulbo *Eriophyes tulipae* Keifer en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.). *Fitosanidad*, 7(2), 37-41.
- Yáñez, P., Escoba, A., Molina, C. y Zapata, G. (2014). Comparación de la actividad acaricida de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum* y *Thymus vulgaris* contra *Tetranychus urticae*. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. 19(1), 21-33.
- Zapata, S. (2012). Manual de laboratorio, microbiología de alimentos. Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. pp. 87.
- Zhang, Z. (2003). Mites of Green houses. Identification, biology and control. School of Life Sciences, Fudan University. CABI Publishing. China, UK, USA. pp. 256.
- Zhiquiong T., Lin, B. y Zhang, R. (2013). A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus*, 2, 543. Doi 10.1186/2193-1801-2-543.



# Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar

## Influence of different factors in the growth of endophytic bacteria of sugarcane

Marcia M. Rojas\*, Anar J. Rodríguez\*\*, Lester González\*\*\*, Mayra Heydrich\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54293

### Resumen

En Cuba, entre los esfuerzos por lograr la sostenibilidad en la agricultura se han empleado biopreparados a gran escala, los cuales han tenido un gran impacto económico, ecológico y social. La caña de azúcar constituye uno de los principales cultivos agrícolas para nuestro país y tiene gran importancia desde los puntos de vista económico y ecológico a nivel mundial. En el presente trabajo se demostró el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento de 5 cepas endófitas de caña de azúcar, 3 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, una de *Bacillus licheniformis* y una de *Enterobacter agglomerans*. De igual forma, se estudió la influencia de jugos provenientes de cinco variedades, así como diferentes concentraciones de las fitohormonas ácido 3 indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA) en el crecimiento. Se demostró que la asparagina y el sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno adicionadas al medio LGI posibilitan un mayor crecimiento de las bacterias endófitas estudiadas. El medio LGI suplementado con jugo de caña de azúcar favorece significativamente ( $p \leq 0,05$ ) el crecimiento de los microorganismos endófitos y no existe relación directa entre el origen varietal del jugo y de las cepas. Por otra parte las fitohormonas en bajas concentraciones favorecieron el crecimiento, no ocurriendo así cuando se encuentran a elevadas concentraciones en el medio de cultivo. Es necesario estudiar todos los factores que pueden influir en la interacción entre la planta y los endófitos para poder utilizar sus potencialidades como promotores del crecimiento vegetal.

**Palabras clave:** PGPB, *Saccharum* sp. híbrido, jugo de caña.

### Abstract

Among the efforts done in Cuba to the sustainability in the agricultural system, one of them is the use of bioproducts, which have a relevant economic, ecological and social impact. The sugarcane is one of main crops in our country and it has a great importance at world level. In the present work is demonstrated the effect of different carbon and nitrogen sources in the growth of 5 endophytic bacteria (three of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, one of *Bacillus licheniformis* and one of *Enterobacter agglomerans*) were demonstrated. As the same form are studied the influence of juices from five varieties, as well as, different concentrations of fitohormones indole3acetic acid and giberelic acid on the growth. Was demonstrated that asparagine and ammonium sulfate as nitrogen sources added to LGI medium enhance the growth a major growth of the studied endophytic bacteria. The LGI medium supplied with juices of sugarcane enhance the growth of microorganisms ( $p \leq 0,05$ ) and don't exist any relationships among the origin of the juice and the strains. On the other hand, the fitohormones at low concentrations don't affect the growth but at high levels of these hormones inhibit the growth. It's necessary to study the factors that have influence on the interaction between the plant and endophytes to use their potentialities as plant growth promoters.

**Key words:** PGPB, *Saccharum* sp. hybrid, juice of cane.

**Recibido:** diciembre 18 de 2014

**Aprobado:** septiembre 23 de 2015

\* PhD, Profesora Titular, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, Autor para correspondencia: marcia@fbio.uh.cu

\*\* M.C., Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, anarodri@ulb.ac.be

\*\*\* Lic., Especialista, del Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. lester.glez@nauta.cu

\*\*\*\* PhD, Profesora Auxiliar Consultante, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, mayra@fbio.uh.cu



## Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) es una planta con altos contenidos de sacarosa, que actualmente representa una de las fuentes de azúcar más importante a nivel mundial, por lo que se cultiva en más de 50 países. El interés por mantener e incrementar la productividad de este cultivo, no solo se sustenta por su utilización en la alimentación humana, sino que también se utiliza en la alimentación animal (Correa et al., 2003; Martín et al., 2005), específicamente en Cuba, se trabaja en la diversificación de la industria azucarera, lo que confiere a este cultivo alto valor agregado.

La agrobiotecnología y la utilización de procesos naturales desempeñan un papel importante en la implementación de la agricultura sostenible, con este objetivo se estudian las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB proveniente de las siglas en inglés plant growth promoting bacteria), en las que se incluyen tanto las bacterias que habitan en la rizosfera, como los rizobios y las bacterias endófitas, todos los cuales pueden beneficiar a los cultivos (Acemad y Kribet, 2014).

Velázquez et al. (2008) describieron la diversidad genética de la comunidad bacteriana endófitas de la savia apoplástica del parénquima medular del tallo de la caña de azúcar cultivada en suelos cubanos. Los géneros *Gluconacetobacter*, *Bacillus* y *Enterobacter* se aislaron a partir de este cultivo, encontrándose los dos primeros entre los más abundantes dentro de la comunidad bacteriana.

El estudio del efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, relacionadas con el medio natural, así como otros componentes del mismo permitirá explicar el comportamiento de los microorganismos endófitos en su hábitat natural, lo que contribuirá a conocer con mayor profundidad la interacción planta-bacteria y a sustentar su utilización en la biotecnología agrícola. Además, este estudio sienta las bases para la formulación de medios de cultivo eficientes basados en fuentes naturales, para el crecimiento de los endófitos.

El presente trabajo tiene como objetivos demostrar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento de cinco cepas endófitas de caña de azúcar. De igual forma, se estudió la influencia de jugos provenientes de cinco variedades, así como diferentes concentraciones de las fitohormonas ácido 3 indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA) en el crecimiento de estas bacterias.

## Materiales y métodos

### Cepas empleadas

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa PAI5 (ATCC 49037) aislada a partir de raíces de caña de azúcar en Brasil (Cavalcante y Dobereiner, 1988), *G. diazotrophicus* cepas 1-05 y 4-02 aisladas de tallos de los cultivares de caña de azúcar Jaronú 60-5 y Media Luna 318, respectivamente (Rojas, 2005), *Bacillus licheniformis* aislada de tallos de la variedad de caña de azúcar Cuba 323-68 (Rojas et al., 2001) y *Enterobacter agglomerans* aislada de tallos de la variedad de caña de azúcar Media Luna 318 (Rojas et al., 2001).

### Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en el crecimiento

Las cepas se cultivaron en medio LGI líquido (en g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,2; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,02; NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,02; FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 0,01; Bromotimol azul (solución al 0.05% en KOH 0,2N) 5 mL) con 10g L<sup>-1</sup> de sacarosa como fuente de carbono (Cavalcante y Dobereiner, 1988) durante 48 horas, a 30 °C y a 150 rpm, y los inóculos se ajustaron a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, según la escala de Mc Farland (NCCLS, 2005) con solución salina al 0.8 % (NaCl 0,8 g en 100 mL de H<sub>2</sub>O). Se preparó medio LGI semisólido (2 g.L<sup>-1</sup> de agar) con las siguientes fuentes de carbono en una concentración final del 1 %: xilosa, sacarosa, inositol, glucosa, fructosa, jugo de caña de azúcar.

Por otra parte, se prepararon medios de cultivo con sacarosa al 1% como fuente de carbono y las siguientes fuentes de nitrógeno en una concentración final de 5 mM: sulfato de amonio, nitrato de potasio, asparagina, triptófano, treonina, arginina y un control sin la adición de nitrógeno.

Se sembraron 100 µL de cada inóculo en 5 mL de medio y se incubaron por 72 horas a 30 °C. Se midió la absorbancia a 600 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



### ***Influencia de jugos de diferentes variedades de caña de azúcar sobre el crecimiento***

Se preparó un inóculo similar al descrito en el epígrafe anterior e igualmente se ajustó a  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>. De esta preparación se tomaron 100 µL para inocular tubos de cultivo que contenían 5 mL de medio LGI líquido y jugo de caña de diferentes cultivares de caña de azúcar para una concentración final de 20 y 30 %, así como un control con azúcar comercial como fuente de carbono. Se utilizaron jugo de caña de cinco cultivares diferentes. Se incubaron las muestras a 150 rpm, 30 °C y se midió la absorbancia a 600 nm a las 24, 48 y 72 horas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### ***Influencia del ácido indolacético y el ácido giberélico en el crecimiento***

Se procedió de forma similar a lo descrito en el epígrafe anterior, utilizando medio SYP: (en g L<sup>-1</sup> sacarosa 10, extracto de levadura 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3, pH=6,2) (Caballero-Mellado y Martínez-Romero, 1994) líquido con diferentes concentraciones finales de ácido 3 indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA) de 0,025, 0,25 y 2,5 mg.L<sup>-1</sup> y como control el medio sin hormonas. Se incubaron las muestras a 150 rpm, 30 °C y se midió la absorbancia a 600 nm a las 24, 48 y 72 horas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### ***Análisis biométricos***

Los resultados de los estudios fisiológicos descritos se analizaron utilizando el paquete estadístico Tonystat (9). Se emplearon pruebas paramétricas y no paramétricas: análisis de varianza, prueba de Kruskal-Wallis, prueba de comparación de medias de Duncan y prueba de comparaciones múltiples no paramétricas.

## **Resultados y discusión**

### ***Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en el crecimiento***

En las cepas estudiadas se pueden observar diferencias significativas en el crecimiento entre los medios con diferentes fuentes de nitrógeno (tabla 1). Para las cepas de *G. diazotrophicus* se destacan los medios con sulfato de amonio y asparagina como fuentes de nitrógeno. Para *B. licheniformis* los medios con sulfato de amonio, nitrato de potasio, asparagina y arginina muestran los mayores valores de crecimiento. Se repiten las dos últimas fuentes de nitrógeno para *E. agglomerans*.

Stephan et al. (1991) probaron la acción de varios aminoácidos sobre la actividad nitrogenasa de *G. diazotrophicus*, Rodríguez et al. (2005) demostraron que con treonina, triptófano, arginina y asparagina como fuentes de nitrógeno, se evidencia inhibición parcial de esta actividad, quizás consecuencia de mecanismos similares de desactivación de la fijación biológica del nitrógeno, posiblemente no tan eficientes, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo en la inhibición del crecimiento.

Esta bacteria ha mostrado su efecto promotor del crecimiento en diferentes cultivos de importancia económica como malanga, yuca y papaya, estudios que se han realizado a nivel de campo y han permitido demostrar su efecto en el incremento de los rendimientos y calidad de los frutos o tubérculos (Dibut et al., 2009).

A las 24 horas de incubación en medios con diferentes fuentes de carbono, no existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas de *G. diazotrophicus* (tabla 2). Sin embargo, para *B. licheniformis* y *E. agglomerans*, se aprecian diferencias en el crecimiento desde las 24 horas, esto era de esperar ya que estas bacterias tienen una tasa de crecimiento mayor que *G. diazotrophicus*.

Los resultados obtenidos con las cepas de *G. diazotrophicus* concuerdan con los presentados por Ureta et al. (1995). Estos autores observaron que existen diferencias entre cepas de la misma especie en cuanto a la utilización de fuentes de carbono. En este trabajo se observan diferencias en el crecimiento en los medios con xilosa, fructosa, inositol, glucosa y pectina. Rojas et al. (2012) al identificar 46 aislados de esta especie a partir de varios cultivares de caña de azúcar, demostraron que hay cepas que no crecen en medio con glicerol, manitol, xilosa e inositol como fuentes de carbono, lo que se corresponde con nuestros resultados. En este trabajo se demuestra que existen comportamientos diferentes en el crecimiento para las cepas estudiadas si se analiza cuantitativamente, aún cuando las cepas crezcan en los medios analizados, lo que resulta importante para la futura utilización agro-



**Tabla 1.** Crecimiento de cepas de endófitos de caña de azúcar en medio LGI con diferentes fuentes de nitrógeno medida en cultivos de 5 mL a través de la absorbancia a 600 nm.

Fuentes de nitrógeno	Cepas									
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>						<i>Bacillus licheniformis</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i>	
	Cepa Pal-5		Cepa 1-05		Cepa 4-02		24 h	48 h	24 h	48 h
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h				
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,093a	0,623b	0,038a	0,325a	0,048ab	0,308ab	0,080cd	0,393b	0,223c	0,355d
KNO <sub>3</sub>	0,000b	0,000e	0,000a	0,000d	0,000b	0,000c	0,027e	0,536a	0,079d	0,439c
Asparagina	0,084a	0,730a	0,009a	0,288ab	0,053ab	0,347a	0,320a	0,399b	0,530a	0,741b
Triptófano	0,074a	0,469c	0,013a	0,216bc	0,071a	0,257b	0,005c	0,89c	0,084d	0,107e
Treonina	0,000b	0,061e	0,032a	0,000d	0,003b	0,018c	0,020e	0,068c	0,030e	0,060ef
Arginina	0,103a	0,370d	0,027a	0,173c	0,032a	0,244b	0,265b	0,419b	0,346b	0,910a
LGI	0,000b	0,000e	0,000a	0,000d	0,000b	0,000c	0,038de	0,029c	0,001e	0,000f

Las letras no comunes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la Prueba de comparación de medias de Duncan. Media de 3 repeticiones.

**Tabla 2.** Crecimiento de endófitos de caña de azúcar en medio LGI con diferentes fuentes de carbono medida en cultivos de 5 mL a través de la absorbancia a 600 nm.

Fuentes de carbono	Cepas									
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>						<i>Bacillus licheniformis</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i>	
	cepa PAL5		Cepa 1-05		Cepa 4-02		24 h	48 h	24 h	48 h
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h				
Xilosa	0,008a	0,019c	0,010a	0,004b	0,005a	0,002b	0,018b	0,200bc	0,144cd	0,268bc
Sacarosa	0,015a	0,140bc	0,021a	0,032b	0,016a	0,053ab	0,052b	0,177cb	0,272a	0,376ab
Jugo de caña	0,010a	0,392a	0,006a	0,241a	0,008a	0,244a	0,175a	0,322ab	0,306a	0,516a
Fructosa	0,027a	0,210b	0,018a	0,100b	0,029a	0,074a	0,014b	0,104d	0,133d	0,155c
Inositol	0,000a	0,061c	0,000a	0,005b	0,005a	0,031b	0,015b	0,267ab	0,285a	0,417a
Glucosa	0,000a	0,198b	0,000a	0,000b	0,002a	0,000 b	0,006b	0,165b	0,199bc	0,276bc
Pectina	0,006a	0,096bc	0,006a	0,079b	0,038a	0,151a	0,043b	0,170b	0,100de	0,208bc
Celulosa	0,016a	0,021c	0,015a	0,027b	0,057a	0,071ab	0,031b	0,034c	0,020e	0,026d
LGI	0,014a	0,055c	0,019a	0,045b	0,001a	0,016b	0,009b	0,348a	0,250ab	0,438a

Media de 3 repeticiones. Las letras no comunes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la prueba de comparación de medias de Duncan.

biotecnológica de estas bacterias. Según han demostrado Dibut *et al.* (2011) se obtienen mejores resultados al asperjar el cultivo de *G. diazotrophicus* a las hojas y el suelo, por lo que la utilización de una amplia gama de fuentes de carbono podría sustentar la sobrevivencia de la bacteria.

Lery *et al.* (2008) mediante estudios de proteómica, identificaron numerosas proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, y otras, en la cepa Pal5, lo que sustenta la utilización de los compuestos analizados en el presente trabajo, incluso Luna y Boiardi (2007) demostraron que la utilización de la glucosa depende del pH del medio.

Por otra parte, Galisa *et al.* (2012) empleando RT-qPCR demostraron la expresión diferenciada de genes de mantenimiento y otros relacionados con a biosíntesis y el catabolismo, en medio LGI suplementado con diferentes fuentes de carbono, lo que corrobora las diferencias en el crecimiento encontradas en este trabajo.





A las 48 horas de crecimiento para *G. diazotrophicus* y desde las 24 horas para *B. licheniformis* y *E. agglomerans* se aprecia la diferencia existente entre el medio que tiene jugo de caña como fuente de carbono y las otras fuentes de carbono utilizadas. El elevado crecimiento en medio LGI con jugo de caña pudiera deberse a la presencia de vitaminas, proteínas y otros compuestos que favorezcan el crecimiento de los microorganismos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el medio LGI con jugo de caña y que existen diferencias en la composición del jugo de los cultivares de caña, se decidió comprobar si la procedencia varietal del jugo ejerce influencia sobre el crecimiento de estas especies por la importancia que esto podría representar al formular un medio de cultivo para la aplicación biotecnológica de estas bacterias en la agricultura.

### **Influencia de jugos de diferentes cultivares de caña de azúcar sobre el crecimiento**

A las 24 y 48 horas de cultivo en el medio LGI suplementado con jugo de caña de diferentes variedades a concentraciones de 20 y 30%, no hay diferencias en el crecimiento de las cepas analizadas.

A las 72 h, en el caso de la cepa 4-02 de *G. diazotrophicus* el crecimiento es significativamente mayor en el medio sin jugo utilizando azúcar comercial al 20 y al 30% (figura 1), lo cual pudiera sugerir que los compuestos presentes en el jugo de la caña de azúcar a determinadas concentraciones estimulan el crecimiento microbiano, pero a partir de una concentración determinada se pudieran producir sustancias que resultan tóxicas e inhiben el crecimiento de algunas cepas.

*Enterobacter agglomerans* y *B. subtilis* a las 72 horas de crecimiento en todos los medios con jugo, superaron en crecimiento al medio LGI con azúcar comercial. En este caso se pudiera pensar en que el jugo de caña ejerce una influencia positiva sobre el crecimiento de las bacterias ya que el jugo de caña contiene cantidades de glucosa y fructosa (0.2-0.6%), nitrógeno orgánico (0.02-0.04%) y vitaminas (Reis *et al.*, 1994). Además, el pobre crecimiento de estos microorganismos en el medio con azúcar comercial, comparado con el crecimiento en el jugo de caña, pudiera indicar la presencia de residuos de la industria de la caña de azúcar que perjudiquen el crecimiento de las bacterias.

Es notable la diferencia del crecimiento en los medios con jugo de los cultivares C1051-73 y Ja605 al 30% para la cepa de *E. agglomerans*, las cuales tienen en común el indicador de sólidos solubles (Brix) y el Porcentaje de Pol (Pol: que está constituido fundamentalmente por sacarosa) (Naranjo, S.).

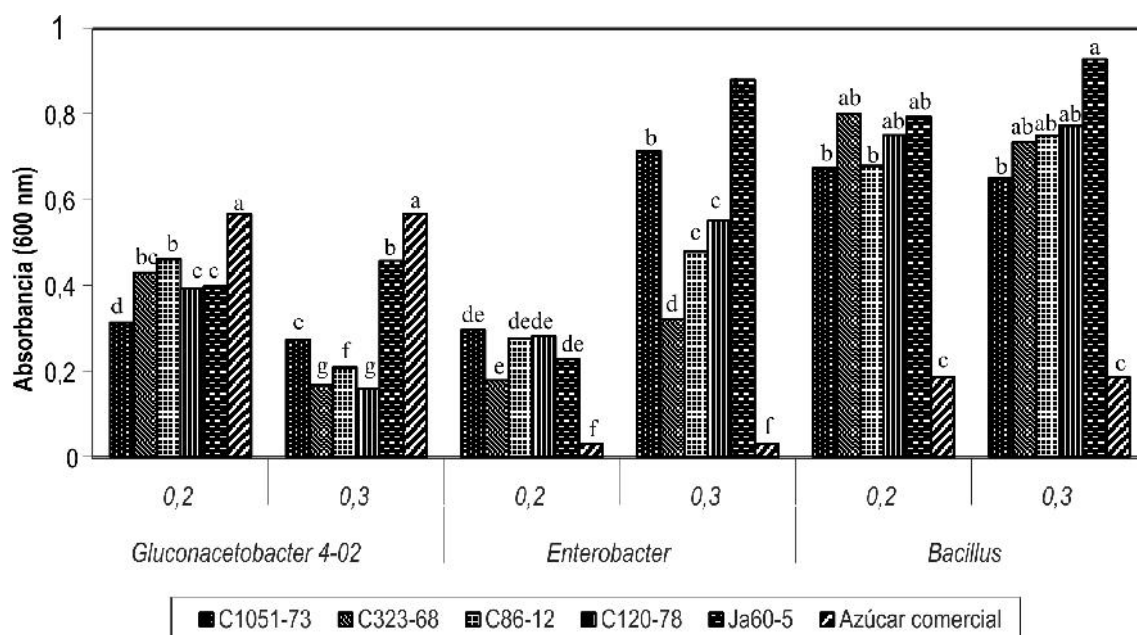
La presencia de grandes cantidades de iones como el  $K^+$  y ácidos orgánicos (Wealburn *et al.*, 1990) entre los sólidos solubles pudieran estimular el crecimiento de *E. agglomerans*, pero es más lógico pensar que influya el porcentaje de Pol, donde fundamentalmente se tiene en cuenta el porcentaje de sacarosa pero también puede estar presentes carbohidratos de mediano peso molecular, que son sustancias ópticamente activas y se ha demostrado que desvían el plano de luz polarizada y pueden influir en las mediciones de sacarosa por polarimetría (De Armas *et al.*, 1999). A su vez, estos carbohidratos pueden ser utilizados por el microorganismo porque son polímeros de fructosa y galactitol (Legaz *et al.*, 1992). Resulta válido aclarar que no se han encontrado en la literatura trabajos que comparen el crecimiento de bacterias en diferentes jugos de caña de azúcar y estos estudios podrían sentar las bases para la formulación de medios de cultivo con fuentes económicas para la aplicación agrobiotecnológica de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

### **Influencia del ácido indolacético y el ácido giberélico en el crecimiento**

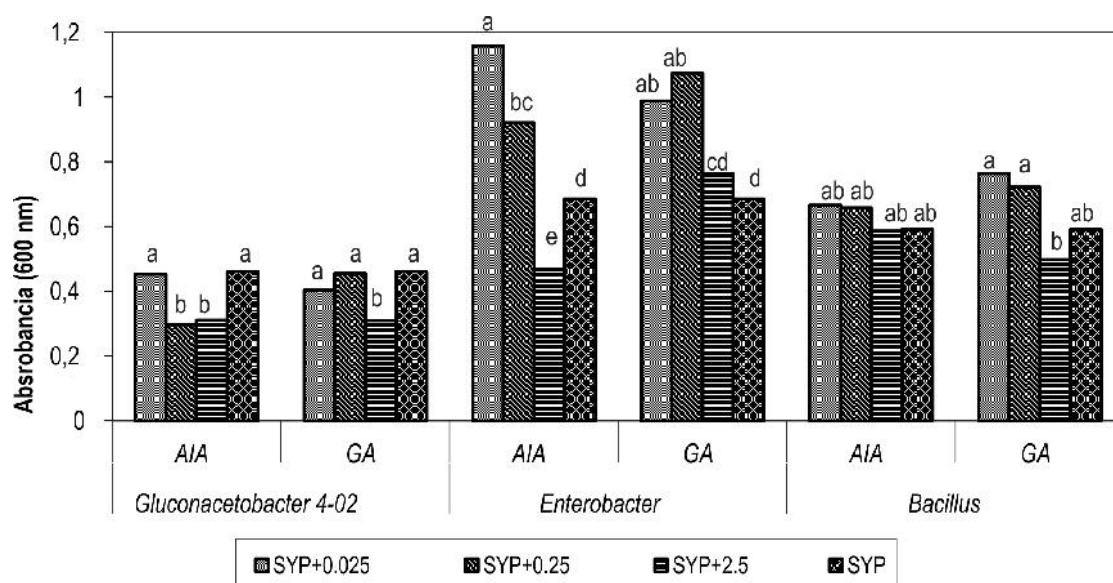
Son muy pocos los estudios realizados donde se analice la interrelación endófito-planta respecto a la influencia de las fitohormonas en la fisiología de las bacterias.

Para *E. agglomerans* se observa que las concentraciones de 0,025 y 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ambas fitohormonas estimulan el crecimiento comparando con el medio SYP sin hormonas a las 72 horas (figura 2). Esto permite inferir que a estas concentraciones de AIA y GA se produce una inducción del crecimiento igual que ocurre con *Azospirillum brasilense* en presencia de AIA, lo cual se explica por una regulación estimuladora de los genes que codifican para la enzima indol-3 piruvato descarboxilasa, que está involucrada en la vía de síntesis de AIA por el microorganismo (Vande Broek *et al.*, 1999).

Por otra parte, el AIA en la planta estimula la síntesis de proteínas debido a que estabiliza el ARN mensajero, lo cual incrementa la tasa de transcripción y el GA<sub>3</sub> potencia la presencia de polirribo-



**Figura 1.** Crecimiento de cepas endófitas de caña de azúcar, en jugos de diferentes cultivares (C1051-73, C323-68, C86-12 y Ja605) añadidos al 20 y 30% al medio LGI, a las 72 horas de cultivo agitado a 150 rpm a 30°C. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma cepa bacteriana para la prueba de comparación de medias de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 2.** Influencia del ácido indolacético (AIA) y el ácido giberélico (GA) en el crecimiento de endófitos de caña de azúcar a las 72 horas de cultivo en medio SYP suplementado con diferentes concentraciones de hormonas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una misma cepa bacteriana para la prueba de comparación de medias de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

somas y aumenta el número de ribosomas por célula (De Armas *et al.*, 1988) y pudiera ejercer una acción similar sobre la célula microbiana.

### Conclusiones

Se puede plantear que la utilización de asparagina y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno adicionales al medio LGI posibilitan un mayor crecimiento de las bacterias endófitas en caña de azúcar.

El medio LGI suplementado con jugo de caña de azúcar favorece significativamente el crecimiento de los microorganismos endófitos y no existe relación directa entre el origen varietal del jugo y el crecimiento de las bacterias, por lo que se podría utilizar en un medio de cultivos para la producción biotecnológica de los endófitos.

El estudio de la ecología de la interacción entre los endófitos y las plantas es de gran importancia, y más específicamente las relaciones de los componentes de la planta, ya sean el jugo o las fitohormonas, pueden resultar sumamente interesantes y abre las puertas para analizar en trabajos futuros la interacción planta-endófito “*in vivo*”.

## Referencias

- Acemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26, 1–20.
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Romero, E. (1994). Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1532-1537.
- Cavalcante, V. A., Döbereiner, J. (1998). A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and Soil*, 108(1), 23-31.
- Sidnei Correa, C.E., Neves Pereira, M., Gisele de Oliveira, S.; Hentz Ramos, M. (2003). Performance of Holteins cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. *Scientia Agricola*, 60(4), 621-629.
- De Armas, R., E. Ortega y R. Rodés. (1988). Metabolismo del nitrógeno en las plantas. En: Fisiología Vegetal, ed. Pueblo y Educación, pp.118-128.
- De Armas, R., E. Ortega, R. Rodés, G. Galvez. (1999). La fisiología vegetal y su contribución al mejoramiento de la caña de azúcar. En: Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. A. Arencibia y M. T. Cornide (eds.), pp. 63-77.
- Dibut, B., Martínez-Viera, R., Ortega, M., Ríos, Y., Tejeda, G., Planas, L. y Rodríguez, J. (2009). Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta-bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus*-cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales*, 30(4), 16-23.
- Dibut, B., Ríos Rocafull, Y. y Ortega García, M. (2011). Estudio de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus* - viandas tropicales establecidas sobre suelo ferralítico rojo. II. Determinación del método de inoculación más eficiente para la incorporación de *G. diazotrophicus* en los cultivos de boniato, yuca y malanga. *Cultivos Tropicales*, 32 (4), 20-26.
- Galisa, P. S., da Silva, H. A. P., Macedo, A. V. M., Reis, V. M., Vidal, M. S., Baldani, J. I. and Simões-Araújo, J. L. (2012). Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 1–7.
- Luna, M. F. and Boiardi, J. L. (2007). Growth yields and glucose metabolism of *N<sub>2</sub>-fixing Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 24, 587–590.
- Legaz, M. E., de Armas, R., Medina, I., Caffaro, C. V., Martínez, M., Mateo, M. (1992). An Approach to the chemical structure of sugarcane mid.molecular weight heterofructans. *Plant Physiology*, 11, 131-140.
- Martín, P. C. (2005). El uso de la caña de azúcar para la producción de carne y leche. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39, 427-439.
- NCCLS. Natural Committee for Clinical laboratory standards. (2005). Performance standards for antimicrobial Disk. Susceptibility Test. *Approved standard*. p. 238.
- Lery, L. M. S., Coelho, A., von Kruger, W. M. A., Goncalve, M. S. M., Santos, M. F., Valente, R. H., Santos, E. O., Rocha, S. L. G., Perales, J., Domont, G. B., Teixeira, K. R. S. and Bisch, P. M. (2008). Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics*, 8, 1631-1644.
- Reis, V. M., Olivares, F. L., Döbereiner, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 401-405.
- Rodríguez, A. J., Trujillo, I. D., Felipe, Y., Rojas, M. M., Manzano, J., y Heydrich, M. (2005). Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófitas de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(1), 66-75.
- Rojas, M. M. (2005). Caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aislado de variedades caña de azúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, p. 99.
- Rojas, M., Manzano, J., Heydrich, M. (2012). Aislamiento e identificación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* a partir de variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 1(1), 1-5.
- Rojas, M. M., Manzano, J., Prieto A. y Heydrich M. (2001). Interrelaciones en la comunidad microbiana endófitas de la caña de azúcar. En: Contribución a la Educación y la Protección Ambiental. VII Taller ISCTN, vol. 2, Soporte Magnético.
- Sigarroa, A. Biometría y Diseño Experimental. (1985). La Habana. Pueblo y Educación, 734 pp.
- Stephan, M. P., Oliveira, M., Texeira, S., Martínez-Drets, G., Döbereiner, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77, 67-72.
- Ureta, A., Álvarez, B., Ramón, A., Vera, M. A., Martínez-Drets, G. (1995). Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetical criteria. *Plant and Soil*, 172, 271-277.
- Vande Broek, A., Lambrecht, Eggmont, E., Vanderleyden, J. (1999). Auxins upregulated expresión of the indole -3- pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1338-1342.
- Velázquez E., Rojas M., Lorite M. J., Rivas R., Zurdo-Piñeiro J. L., Heydrich M., Bedmar E. J. (2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*, 48(2), 118-124.
- Wealburn, G. E. y F. C. Meinzer. (1990). Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiology*, 93, 1147-1153.



# Establecimiento *in vitro* de *Hypericum goyanesii* Cuatrec. E *Hypericum juniperinum* Kunth, a partir del cultivo de semillas

## Establishing *in vitro* *Hypericum goyanesii* Cuatrec. E *Hypericum juniperinum* Kunth, from seeds culture

Belkys Adriana Pérez-Martínez\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54294

### Resumen

El propósito de este estudio fue evaluar medios de cultivo de germinación para el establecimiento *in vitro* de *Hypericum goyanesii* e *Hypericum juniperinum* como estrategia de conservación *ex situ*, por medios biotecnológicos de especies vegetales pertenecientes al ecosistema alto-andino. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio y se sembraron en seis tratamientos basados en los medios de cultivo Murashige & Skoog (MS) y MS con reducción del 50% de sus macro y microsales y vitaminas, con y sin la adición de carbón activado y pulpa de banano. La germinación se favoreció por el empleo de pulpa de banano en el medio MS con reducción de sales y suplementado con carbón activado. Fue posible evidenciar que los explantes sexuales de *H. goyanesii* e *H. juniperinum* estuvieron influenciados positivamente en la variable porcentaje de germinación, por el empleo de sustancias orgánicas en reemplazo de reguladores de crecimiento.

**Palabras clave:** Hypericaceae, cultivo *in vitro*, germinación, desinfección, medios de cultivo.

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate germination culture media for the *in vitro* establishment *Hypericum goyanesii* e *Hypericum juniperinum* as *ex situ* conservation strategy for biotechnology of plant species belonging to the high-Andean ecosystem. The seeds were disinfected with sodium hypochlorite and seeded into six treatments MS and MS with 50% reduction of its macro and microsales and vitamins, with and without the addition of activated charcoal and pulp banana. Germination is favored by the use of banana pulp in MS medium with reducing salts and supplemented with activated charcoal. It was possible to show that sexual explants and *H. goyanesii* e *H. goyanesii juniperinum* were influenced positively variable germination percentage, by the use of organic substances to replace growth regulators.

**Key words:** Hypericaceae, *in vitro* culture, germination, disinfection, culture medio.

**Recibido:** marzo 6 de 2015

**Aprobado:** octubre 16 de 2015

### Introducción

A nivel mundial son serias las amenazas que presentan los ecosistemas de montaña, representando los daños más extremos y significativos los Andes (Okada, 2001), que es la cadena montañosa más extensa del mundo y de la cual hace parte el páramo, considerado como uno de los ecosistemas con mayor afectación antrópica del continente (Morales y Estévez, 2006). Colombia no ha sido ajena a ésta problemática, ya que los páramos vienen sufriendo serios procesos de transformación, alteración y degradación, debido a acciones antrópicas como la quema; el empleo de elementos leñosos para combustible y cercas vivas; actividades agrícolas como pastoreo y pisoteo, residuos agropecuarios, corrimiento de límites agrícolas; actividades agrícolas y las obras de urbanismo y civiles, entre otros (Contraloría General de la República, 2012). De ésta forma, se hace necesario generar conocimiento e investigación científica, como elementos fundamentales para asegurar la conservación de la biodiversidad (Josse C. et al., 2009).

\* Ing. de Producción Biotecnológica. Profesional de investigación líder en propagación *in vitro*. Subdirección Científica. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. baperez@jbb.gov.co





Bajo éste concepto, el Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis - JBB emplea el Cultivo de tejidos vegetales como una estrategia de conservación *ex situ* de especies nativas promisorias altoandinas y de páramo. Dos de las especies priorizadas, dentro de ésta línea de investigación, corresponden a *H. goyanesii* e *H. juniperinum*, debido a su potencial para la conservación, reintroducción o restauración ecológica.

Teniendo en cuenta que para éstas dos especies se hace necesario desarrollar estudios que determinen los aspectos que influyen en la germinación de sus semillas y que a su vez den lineamientos para un manejo y aprovechamiento adecuados de las mismas, se planteó la presente investigación que tuvo como objetivo evaluar las respuestas germinativas *in vitro*, en seis medios de cultivo. Se busca que con la metodología aquí expuesta se generen plántulas completas que sean utilizadas como fuente de explantes para los estudios de micropropagación.

## Materiales y métodos

Las salidas de campo para la colecta de material vegetal se realizaron en el departamento de Cundinamarca: los frutos de *H. goyanesii* fueron colectados en la reserva El Tablazo, vía al municipio de Subachoque (N 5° 00' 56.5" - W 74° 12' 34.0" con una altitud de 3437 m.s.n.m.). El material vegetal de *H. juniperinum* fue colectado en el páramo de Sumapáz a 3690 m.s.n.m., bajo el siguiente registro geográfico: N 4° 17' 24.2" - W 74° 12' 28.9". Los frutos colectados fueron transportados en bolsas plásticas al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección Científica del JBB, dónde las semillas fueron recuperadas, limpiadas y almacenadas durante 2 meses a 4 °C.

Las semillas maduras fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial, sumergiéndolas durante 10 minutos en agitación constante, en una solución de hipoclorito de sodio al 5% con dos gotas de tween 20. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua microfiltrada estéril y se depositaron en tubos eppendorf con el fin de llevar a cabo una nueva desinfección empleando la centrifuga. En el proceso de centrifugado se realizó un enjuague con hipoclorito de sodio al 5%, seguido de tres enjuagues con agua microfiltrada estéril. Para cada uno de los enjuagues se manejó un tiempo de 5 minutos y una rotación de 5000 rpm (Pérez-M, 2014).

Se elaboraron seis tratamientos de germinación basados en las sales minerales y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% (MS) y al 50% (½ MS) (tabla 1). El empleo de la pulpa de banano y del carbón activado en los tratamientos T2, T3, T5 y T6, se realizó con la finalidad de evaluar su influencia en la germinación de las especies en estudio, teniendo en cuenta los resultados que éstas sustancias han proporcionado en la germinación *in vitro* de otras especies, especialmente pertenecientes a la familia Orchidaceae. Los suplementos empleados en todos los tratamientos fueron sacarosa (15000 mg/l) y agar (5000 mg/l).

Los nutrientes del medio de cultivo fueron pesados en una balanza analítica de precisión y disueltos en agua microfiltrada. Se emplearon recipientes de vidrio con una capacidad de 100 ml para la distribución de 20 ml de medio en cada uno de ellos. El pH del medio fue ajustado a 5,8 y la esterilización se realizó en una autoclave a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (15 lb/in<sup>2</sup>) durante 15 minutos, con una temperatura de vapor aproximada de 121.5 °C.

**Tabla 1.** Tratamientos para inducir la germinación en semillas de *H. goyanesii* e *H. juniperinum*

Tratamientos	Descripción
T1	½ MS
T2	½ MS + 2000 mg/l de carbón activado
T3	½ MS + 2000 mg/l de carbón activado + 30000 mg/l de pulpa de banano
T4	MS
T5	MS + 2000 mg/l de carbón activado
T6	MS + 2000 mg/l de carbón activado + 30000 mg/l de pulpa de banano



Las semillas una vez desinfectadas, fueron sembradas en los seis tratamientos de germinación ya descritos. Se sembraron cuatro semillas por frasco de vidrio con medio de cultivo. Se manejaron para *H. goyanesii* cinco repeticiones, por tratamiento de germinación. El total de semillas evaluadas para ésta especie fue 120. Para *H. juniperinum* se sembraron tres repeticiones, con un total de 72 semillas evaluadas. Los frascos se mantuvieron en la sala de incubación durante 18 y 12 semanas, respectivamente, tiempo en el cual se llevó a cabo el registro de la variable germinación. Se manejó un fotoperiodo natural (12/12), con un rango de temperatura entre 19 °C y 27 °C y humedad del 60 % al 80 %. La intensidad lumínica estuvo comprendida entre 1500 lux y 5000 lux.

**Análisis estadístico.** Se aplicó un diseño experimental completamente al azar para cada una de las dos especies priorizadas. La variable registrada fue el porcentaje de germinación. Los resultados de ésta variable fueron sometidos, por medio del programa estadístico SAS, a un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó la prueba de comparación Múltiple Duncan, con un nivel de confiabilidad del 95%.

### Resultados y discusión

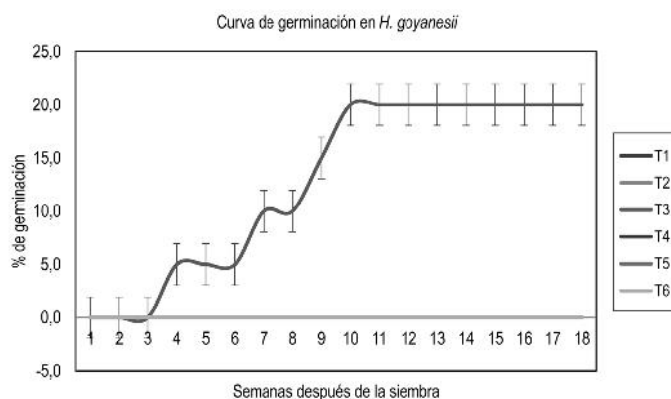
El esquema de desinfección brindó una contaminación del 0% en las semillas. Éste esquema fue comparado por Pérez-M, 2014, con otras dos metodologías de desinfección, en las cuales la contaminación promedio registrada en las semillas de *H. goyanesii* e *H. juniperinum* fue del 47,5 %.

Se puede determinar que los frutos colectados en su medio natural contaban con buenas condiciones sanitarias que facilitaron la desinfección completa con el empleo del hipoclorito de sodio, el cual es una de las sustancias comúnmente recomendadas para la desinfección superficial de materiales a introducir al cultivo *in vitro* (Abdelnour y Muñoz, 2005), es útil como germicida y agente oxidante y presenta las ventajas de ser muy eficiente para éste propósito, de ser enjuagado fácilmente y de ser muy económico (Suárez, 1997).

Los porcentajes de germinación obtenidos se dan a continuación para cada especie evaluada:

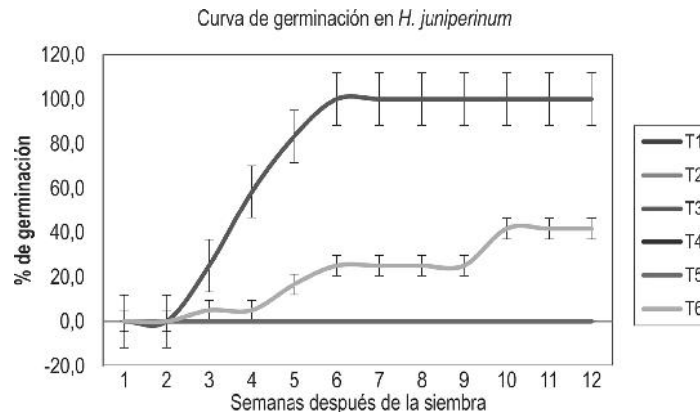
***Hypericum goyanesii*.** El seguimiento a la variable germinación se realizó durante 18 semanas. Los porcentajes fueron nulos (0%) para todos los tratamientos, excepto para el **T3** ( $\frac{1}{2}$  MS suplementado con 2000 mg/L de carbón activado y 30000 mg/L de pulpa de banano), en donde se registró una germinación del 20% al término del tiempo total de evaluación. De ésta forma, se observa que la curva de germinación (figura 1), quedó representada por el único tratamiento que brindó condiciones óptimas para la germinación. Al realizar ANOVA se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $P= 0.0471$ ). La prueba de comparación múltiple Duncan indicó que el tratamiento que era estadísticamente diferente a los demás, por producir el único efecto en la variable germinación, fue el **T3**.

***Hypericum juniperinum*.** Durante las 12 semanas de seguimiento al material sexual de *H. juniperinum*, la variable germinación fue del 0% para los medios de cultivo **T1**:  $\frac{1}{2}$  MS, **T2**:  $\frac{1}{2}$  MS+ 2000 mg/L de carbón activado, **T4**: MS y **T5**: MS + 2000 mg/L de carbón activado y **T6**: MS + 2000 mg/L de carbón activado.



**Figura 1.** Seguimiento, durante 18 semanas después de la siembra, a la variable porcentaje de germinación en *H. goyanesii*.

Para el medio **T6**: MS suplementado con 2000 mg/L de carbón activado y 30000 mg/L de pulpa de banano, los procesos germinativos iniciaron en la tercera semana de evaluación con un porcentaje del 5%, el cual se incrementó hasta el 41,6% en la décima semana de seguimiento. Con el medio **T3**: ½ MS suplementado con 2000 mg/L de carbón activado y 30000 mg/L de pulpa de banano, las semillas iniciaron su germinación en un 25% en la tercera semana de evaluación, siendo ésta del 100% en la sexta semana de seguimiento. En la figura 2, se representa la curva de germinación para *H. juniperinum*, en donde sólo es posible apreciar la respuesta germinativa en los tratamientos T3 y T6, ya que en los demás ésta fue nula (0%). Al realizar la prueba ANOVA se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $P < 0.001$ ). La prueba de comparación múltiple de Duncan determinó que bajo el T3 se obtuvo el mayor valor de la media (100) para la variable evaluada.



**Figura 2.** Seguimiento, durante 12 semanas después de la siembra, a la variable porcentaje de germinación en *H. juniperinum*.

Las semillas de *H. goyanesii* e *H. juniperinum*, mostraron un requerimiento específico de reducción en un 50% de las concentraciones de sales minerales y vitaminas presentes en el medio MS. Resultados similares fueron obtenidos por Pérez-M, 2012, quien reportó que el mayor porcentaje de germinación *in vitro* (62,5%) para *Hypericum mexicanum* L., en un tiempo de evaluación de 15 semanas, se registró con el medio ½ MS suplementado con 2000 mg/L de carbón activado.

Cuando ésta composición nutritiva del medio MS unida al carbón activado, fue suplementada con pulpa de banano, se pudo favorecer los porcentajes de germinación en *H. goyanesii* e *H. juniperinum*. El carbón activado, se usa para absorber sustancias tóxicas de la microatmósfera gaseosa, generadas durante la incubación *in vitro* (Arditti y Ernst, 1993; Pedroza *et al.*, 2010). El banano, posee un alto contenido de azúcares, vitaminas, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento (Arditti, 1993; Kitsaki *et al.*, 2004; Moreno y Menchaca, 2007; Yam y Arditti, 2009; Yong *et al.*, 2009).

## Conclusiones

Considerando que un factor clave en los procesos de propagación *in vitro* es el lograr la desinfección de explantes, en algunas ocasiones alcanzar este objetivo se convierte en un problema al no disponer de material vegetativo o disponer de él pero en un alto grado de contaminación al colectarlo en condiciones naturales, se plantea que el uso de semillas, como material de partida, es una muy buena alternativa en la obtención de explantes en condiciones asépticas, al inducir su germinación *in vitro*.

Se determinaron los requerimientos nutricionales para la germinación de las especies. La pulpa de banano mejoró las condiciones nutritivas del medio ½ MS y permitió, junto al carbón activado, la germinación completa en un tiempo de seis semanas para *H. juniperinum*. Las mismas condiciones nutritivas fueron las únicas que brindaron una germinación total del 20%, al término de 18 semanas para la especie *H. goyanesii*.

Para ambas especies, son necesarios mas estudios para dilucidar aspectos como germinación por métodos tradicionales o convencionales, la naturaleza y concentración de sustancias inhibitorias de la germinación, requerimientos de luz y pretratamientos de germinación. Sin embargo, se considera que los resultados aquí presentados pueden servir para el desarrollo de un sistema de producción *in*



*vitro* que posibilite la obtención de plantas completas, a partir de semillas, para ser reintroducidas en su hábitat natural.

### Agradecimientos

Al Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis-JBB, bajo la dirección del Dr. Luis Olmedo Martínez Zamora; al Subdirector Científico Mauricio Díazgranados y a la Coordinadora del programa 2, Sandra Liliana Castañeda Garzón, por haberme brindado la oportunidad de conformar el equipo de la Subdirección Científica.

### Referencias

- Abdelnour, A., Muñoz, A. (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: *Revista Forestal*, 2(5), 11 p.
- Arditti, J., Ernst, R. (1993). *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. 1-25.
- Contraloría General de la República. (2012). Informe del estado de los Recursos Naturales y del ambiente 2012 y 2013. Recuperado de [http://www.contraloriagen.gov.co/documents/10136/76600464/INFORME\\_MEDIO\\_AMBIENTE\\_2012\\_2013\\_def\\_web.pdf](http://www.contraloriagen.gov.co/documents/10136/76600464/INFORME_MEDIO_AMBIENTE_2012_2013_def_web.pdf).
- Josse C., Cuesta F., Navarro G., Barrena V., Cabrera E., Chacón-Moreno E., Ferreira W., Peralvo M., Saito J., Tovar A. (2009). Ecosistemas de los Andes del Norte y Centro. Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Secretaría General de la Comunidad Andina, Programa Regional ECOBONA-Intercooperation, CONDESAN-Proyecto Páramo Andino, Programa BioAndes, EcoCiencia, NatureServe, IAvH, LTA-UNALM, ICAE-ULA, CDC-UNALM, RUMBOL SRL. Lima.
- Kitsaki, C., Zygouraki, S., Ziobora, M., Chintziest, S. (2004). *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*, 23, 284-290.
- Morales-Betancourt, J. A., Estévez-Varón, J. V. (2006). El Páramo: ¿Ecosistema en vía de extinción? *Revista Luna Azul*, 22, 39-51.
- Moreno-Martínez, D; Menchaca-García, R. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea trigina* Bateman (Orchiadeace). *Foresta Veracruzana*, 9(2), 27-32.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Okada-Katsuo, A. (2001). La biodiversidad y los peligros que la amenazan. En: Perea Dallos Margarita (ed). *Biotecnología agrícola: Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Bogotá: Editora Guadalupe, pp. 29 - 41.
- Pedroza-Manrique, J.A., Serrato-Muñoz, L.C., Castaño-Robayo, M. (2010). Efecto del carbón activado y ácido indol acético en el desarrollo de protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12 (2), 86-102.
- Pérez-Martínez, B.A. (2014). Protocolos de propagación por técnicas biotecnológicas de dos (2) especies priorizadas (*Hypericum goyanesii* Cuatrec. e *Hypericum juniperinum* Kunth) para la conservación, reintroducción, restauración y ecología urbana y su validación masiva. Informe técnico inédito contrato 600-2013. Jardín Botánico José Celestino Mutis-Subdirección Científica. Bogotá D.C.
- Pérez-Martínez, B.A. (2012). Protocolos de propagación por técnicas biotecnológicas de dos especies priorizadas en el proyecto 318 (*Hypericum mexicanum* y *Diplostephium rosmarinifolium*) y apoyo en actividades de transferencia de información a la comunidad. Informe técnico inédito contrato 209-2012. Jardín Botánico José Celestino Mutis-Subdirección Científica. Bogotá D.C.
- Suárez, A. E. (1997). Métodos de asepsia y esterilización. En: M. Perea y J. Cedeño (Eds.). *Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Aplicaciones en la Agricultura*. Curso: UDO-OIEA, Maturín, Venezuela. Pp. 33-40.
- Yam, Tim., Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3 (1), 1-56.
- Yong, J., Ge, L., Yan, F., Ngin, S. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144-5164.



## Comité evaluador

La Revista Colombiana de Biotecnología ofrece sus agradecimientos a los siguientes docentes quienes actuaron en el presente número como Comité de Arbitraje:

Aragón, Oscar, Ing., MSc, cPhD,  
Grupo de Bioprocesos y Bioprospección,  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,  
Colombia, oscarleo1@yahoo.com

Bernal, Mauricio, MSc., cPhD Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
jmbernalmo@unal.edu.co

Bertolde, Fabiana Z., Inst Fed Educ Ciencia & Tecnol, Eunapolis,  
BA, Brasil, fzbertolde@yahoo.com.br

Bustamante R., Silvia L., Bióloga, MSc., Instituto de  
Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
slbustamanter@unal.edu.co

Buitrago Hurtado, Gustavo, IQ, MSc., Instituto de  
Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
gbuitragoh@unal.edu.co

Caicedo M., Luis. A., MSc., PhD., Facultad de Ingeniería,  
Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
lacaicedom@unal.edu.co

Carrillo-Castañeda, Guillermo, PhD., Colegio de Postgraduados,  
México, carrillo@colpos.mx

Castillo Quiliano, Andrés, PhD., Universidad Nacional  
Intercultural de la Amazonia Peruana, Perú,  
acastillo\_2519@hotmail.com

Castillo, María L., MSc., Facultad de Ciencias Exactas Químicas  
y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina,  
mlc\_827@hotmail.com

Cerón Rincón, Laura E., MSc., PhD(C) Biotecnología, Instituto  
de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,  
Colombia, lauraceron16s@gmail.com

Cerrutti, Patricia, MSc., PhD., Universidad de Buenos Aires,  
Argentina, cerrutti@di.fcen.uba.ar

Cohen, Ana C., PhD., Consejo Nacional de Investigaciones  
Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina,  
acohen@fca.uncu.edu.ar

Corredor, Gloria, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad  
Nacional de Colombia, Colombia, gacorredorh@unal.edu.co

Costa Rodrigues, Antônia Alice, MSc., PhD., Laboratório de  
Fitopatologia, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA),  
Brasil, aacordrigues@bol.com.br

Chaparro-Giraldo, Alejandro, Agronomical Engineer, MSc.,  
Ph.D. Associated professor, Departamento de Biología,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia,  
achaparro@unal.edu.co

Chan Cupul, Wilberth, PhD., Instituto de Ecología A. C.  
(INECOL), México, wilberth\_20@hotmail.com

Criollo, Hernando, PhD., Faculty of Agricultural Sciences,  
Universidad de Nariño, Colombia, hcriolloescobar@gmail.com

Cruz-Hernández, Andrés, MSc., PhD., Facultad de Ingeniería,  
Campus Aeropuerto, Universidad Autónoma de Querétaro,  
Santiago De Querétaro, México, andrex1998@hotmail.com

Daza Merchán, Zunny Tatiana, Microbióloga Industrial MSc.,  
Microbiología Industrial. CENICAÑA, Colombia,  
tdaza@cenicana.org

De Almeida, J.A.S., PhD., Centro de Café 'Alcides Carvalho',  
Instituto Agronômico de Campinas, Brazil,  
julietasa@iac.sp.gov.br

Del Real Olvera, Jorge, PhD Ciencias Ambientales, Instituto de  
Investigaciones Multidisciplinarias, Universidad Veracruzana,  
México, jdelreal@uv.mx, jdelreal196@hotmail.com

Enríquez del Valle, José Raymundo, PhD., División de Estudios  
de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico del Valle de  
Oaxaca, México, jenriquezdelvalle@yahoo.com

Escudero Agudelo, Janneth, MSc., Microbióloga Industrial y  
Ambiental, CENICAÑA, Colombia,  
janyudeal12@gmail.com

Fernandez Da Silva, Rafael, MSc., PhD., Facultad Experimental  
de Ciencia y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela,  
rfernandez2@uc.edu.ve

Fernández-Rendón, Carlos L., PhD., Departamento de  
Hidrobiología, Div. Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México,  
carlosfdz7@hotmail.com

García Romero, Ibonne Aydee, MSc., PhD., Instituto de  
Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
ibonne@gmail.com

González Sáyer, Sandra Milena, MSc. Microbiología, Lab  
de marcadores moleculares, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
milenasayer@gmail.com

Groposo, Claudia, Bióloga, MSc., PETROBRAS, CENPES/  
PDEDS/BIO, groposo@petrobras.com.br

Gutkind, Gabriel O., MSc., PhD Facultad de Farmacia y  
Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina,  
ggutkind@fyb.uba.ar

Hernández, Annia, MSc., PhD., Departamento de  
Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana,  
Cuba, annia@bio.uh.cu

Hernández-Delgado, S., MSc., PhD., CBG-IPN, Mexico,  
shernandezd@ipn.mx

Iracheta-Donjuan, Leobardo, MSc., PhD., Instituto Nacional  
de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mexico,  
iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

Jiménez, Pedro, MSc., Universidad Militar Nueva Granada,  
Colombia, pedrojimenez@unimilitar.edu.co

Liao, Yue Ken, PhD., National Chiayi University, Taiwan,  
ykliao@mail.nyu.edu.tw

López, Iván, MSc., Facultad de Ingeniería, Universidad de la  
República, Uruguay, ivanl@ing.edu.uy

Malagón Romero, Dionisio H., PhD., Facultad de Ingeniería,  
Universidad Santo Tomás, Colombia,  
dionisioimalagon@usantotomas.edu.co

Massa, Rosana, PhD., Universidad de Buenos Aires, Argentina,  
romassa2001@yahoo.com.ar

Mojica-Nava, Eduardo, PhD., Associate Professor, Department  
of Electrical and Electronics Engineering, Universidad Nacional  
de Colombia, Colombia, eamojican@unal.edu.co

Monja-Mio, K.M, PhD., Centro de Investigación Científica de  
Yucatán, Mexico, kellymabel@hotmail.com

Monsalve Fonnegra, Zulma Isabel, PhD en Biotecnología,  
Investigadora grupo AgroBiotecnología y docente Instituto de  
Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad  
de Antioquia, Colombia, zmonsalve@gmail.com, zulma.  
monsalve@udea.edu.co

Nervarez-Moorillon, Guadalupe V., PhD., Univ Autonoma  
Chihuahua, Fac Ciencias Químicas Chihuahua, México

Nieto, Ivonne Jeannette R., MSc., PhD., Departamento de  
Química, Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
ijnietor@unal.edu.co

Ochatt, Sergio Javier, PhD., INRA, C.R. de Dijon, URGAP,  
Laboratoire de Physiologie et Culture in Vitro, France, ochatt@  
epoisses.inra.fr

Pabón, Miguel Angel, MSc., Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional de Colombia, Colombia, miguelpabon@  
gmail.com

Pasa, Mateus, PhD., Researcher at Epagri - Temperate Fruit  
Crops, Experimental Station of São Joaquim/SC, Brasil,  
mateus.pasa@gmail.com

Passone, María Alejandra, PhD., Ecología Microbiana,  
CONICET-UNRC, Universidad Nacional de Río Cuarto,  
Argentina, apassone@exa.unrc.edu.ar

Peraza, Andrés, Ing. Agr., MSc, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
andresp8503@gmail.com

Pitta, Sandra, MSc., PhD., Adjunct Researcher CONICET,  
Department of Biodiversity and Experimental Biology, School  
of Exact and Natural Sciences, Universidad de Buenos Aires,  
spitta1959@gmail.com

Pinzón Gutiérrez, Yeimy Alexandra, MSc., Instituto de  
Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
yeialep@gmail.com

Priminho Pirovani, PhD., Carlos, Prof. Titular A-DCB/UESC,  
Laboratório de Proteômica, Centro de Biotecnologia e  
Genética, Brasil, pirovanicp@uesc.br

Ramírez Caicedo, Lilian, MSc., PhD., Universidad Francisco de  
Paula Santander, Colombia,  
lili\_biotechnology@yahoo.es

Reguero Reza, María Teresa, MSc., Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional de Colombia, Colombia,  
mreguero@unal.edu.co

Rosas-Cárdenas, Flor de Fátima, MSc., PhD, Laboratorio  
Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO),  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto  
Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México,  
Frosasc@ipn.mx

Rosas García, Ninfa María, MSc., PhD Laboratorio de  
Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica,  
Instituto Politécnico Nacional, México, nrosas@ipn.mx

Ruiz Avila, Camilo Andrés, MSc.(c), Ing Agron, Instituto de  
Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá,  
Colombia, caaruizav@unal.edu.co

Sánchez López, Diana Beatriz, MSc., Corporacion Colombiana  
de Investigacion Agropecuaria, Colombia,  
dbsanchez@corpoica.org.co

San José, M<sup>a</sup> del Carmen, MSc., PhD., IIAG. CSIC, Spain,  
sanjose@iiag.csic.es

Serrano Riaño, Julieth, MSc., Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia,  
juliethse@hotmail.com

Schmitz, Juliano Dutra, MSc., PhD., Univ Fed Pelotas, Programa  
Posgrad Agron, Dept Fitotecnica, BR-96010900 Pelotas, RS,  
Brazil, jdsagro@gmail.com

Sosa-Echeverría, Rodolfo, PhD., Universidad Nacional  
Autónoma de México, México, rodsosa@unam.mx

Tezara, Wilmer, PhD., Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas,  
Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental,  
Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela, wilmer.tezara@ciens.ucv.ve

Vacca Molina, Maritza, PhD., Facultad de Ciencias Naturales,  
Universidad Nacional de Salta, Argentina,  
maritzavaccamolina@yahoo.com.ar

Valladares, Silvia, MSc., Jefa de laboratorio de Biotecnología  
Vegetal, Fundación Promiva, España,  
sanjose@iiag.csic.es

Vargas, Edith Teresa, PhD., Biotecnología Vegetal, Universidad  
Central de Venezuela, Venezuela, teoriedu@cantv.net

Viana da Silva, Marcondes, PhD., Prof. Pleno, DSC.,  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB,  
Departamento de Ciências Exatas e Naturais - DCEN, Brasil,  
mviana@uesb.edu.br, mviana@hotmail.com

Zepeda-Gómez, Carmen, PhD., Universidad Autónoma del  
Estado de México, México, zepedac@uaemex.mx

## Autores – Authors

### A

Abalos, A., Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n. Santiago de Cuba. CP 90500. aabalos@uo.edu.cu.

Alemán, Silvia, MSc., Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

Alvez, Beatriz, PhD Ciencias. Laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos, Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, Venezuela. beatriz.alvez@ciens.ucv.ve.

Ampudia Mesias, Elisabet, MSc., Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. elisabet.ampudia@correounivalle.edu.co.

Arboleda Echavarría, Carolina, MSc., PhD Ciencias Químicas. Grupo de Investigación Biopolímer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, UdeA, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. carolina.arboleda@udea.edu.co

Arcos Andrade, Andrea, Ingeniera Biotecnóloga, Docente Escuela de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas de la Salud y la Vida, Universidad Internacional del Ecuador, Collacoto – Quito, Ecuador. aarcos.47@gmail.com.

Armijos González, Rosa, Environmental engineer, PhD student. Departamento de Ciencias Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. P.C. 1101608. San Cayetano Alto, Ecuador. rearmijos@utpl.edu.ec.

Avellaneda, Laura, MSc en Ciencias Biológicas - Área Microbiología, Investigadora Master, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA. lavellaneda@corpoica.org.co.

### B

Basail Pérez, Milagros, Investigador Auxiliar. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT. Cuba.

Beovides García, Yoel, Investigador Auxiliar. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT. Cuba.

Bocardo-Delgado, Edwin, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

Bonilla, Ruth Rebeca, Licenciada en Biología y Química, MSc., PhD., Directora Laboratorio de Suelos, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA. rbonilla@corpoica.org.co.

Bravo Montaña, Enrique, PhD., Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. enrique.bravo@correounivalle.edu.co.

### C

Campillo-Pedroza, Natalia, Grupo de Medicina Molecular y de Translación. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, Colombia. naticampillo@gmail.com.

Cancino-Escalante, Giovanni Orlando, Profesor Asociado PhD. Universidad de Pamplona - Facultad de ciencias básicas – Departamento de Biología. Km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. gcancino@unipamplona.edu.co

Capdesuñer, Yanelis, MSc., Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba.

Caro Vélez, C.A, Grupo BIOALI, Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia. Calle 67 No 53-108. Medellín, Colombia. carlos.carou@udea.edu.co

### D

Demey, JR., PhD., Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle Sartenejas. Baruta. Caracas, Estado Miranda, Venezuela. Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Guayaquil, Ecuador (Dirección actual).

Díaz, A., Empresa del Níquel “Comandante Che Guevara” Moa-Holguín. Cuba. CP 83329.

Díaz Carvajal, Claudia. MSc Universidad de Pamplona - Facultad de ciencias básicas – Departamento de Biología. Km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. gcancino@unipamplona.edu.co.

Dueñas-Gonza, Alex, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

### F

Falconí Borja. Carlos, Doctor en Ciencias Naturales, Gerente General, Plantsphere Laboratories, Bellavista de Carretas – Quito, Ecuador drfalconi-labs@biosftware.de.

Fernández, O., Empresa Puerto-Moa, Municipio Moa, Holguín.

Franco Salazar, Juan Pablo, Grupo de Medicina Molecular y de Translación. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, Colombia. jp.salazar04@gmail.com.

### G

Gallego-Gómez, Juan Carlos, Grupo de Medicina Molecular y de Translación. Facultad

de Medicina. Universidad de Antioquia, Colombia. juanc.gallegomez@gmail.com.

García Lozano, Diana Lorena, Bióloga, Universidad del Tolima, AA 546. dianagarcia88@gmail.com.

Giraldo Cervantes, Keren Natalia, Bióloga, Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. keren.giraldo@correounivalle.edu.co.

Gómez, Martha, PhD, Directora Planta de Bioproductos, Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. mgomez@corpoica.org.co.

González, Lester, Lic., Especialista, del Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. lester.glez@nauta.cu.

Guilarte, A., Centro de estudios del medio ambiente. Facultad de Geología y Minas. Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa. Las Coloradas s/n, Moa, Holguín, Cuba. CP 83329. aguilarte@ismm.edu.cu.

### H

Heydrich, Mayra, PhD, Profesora Auxiliar Consultante, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, mayra@fbio.uh.cu.

Hernández, Martha, PhD, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba.

Huarachi-Olivera, Ronald, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n. biomining.ecotoxicology@gmail.com.

### I

Infante, Diógenes, PhD., Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle Sartenejas. Baruta. Caracas, Estado Miranda, Venezuela.

### J

Jordán Zimmermann, Miguel, PhD., in Plant Physiology and Plant Biotechnology, Instituto de Biotecnología. Universidad Mayor. Camino La Pirámide 5750, Huechuraba, Chile. mjordanz@gmail.com.

### L

Larrea Izurieta, Isabel, Agrobiotecnología, Escuela de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas de la Salud y la Vida, Universidad Internacional del Ecuador, Collacoto – Quito, Ecuador; y Responsable de laboratorio, Plantsphere Laboratories, Bellavista de Carretas – Quito, Ecuador. marisa.larrea@hotmail.com.

Lázaro-Puma, Ronny, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de

Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

León Peláez, A.M, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115. (1900). La Plata, Argentina. anleon@biol.unlp.edu.ar.

López Legarda, Xiomara, MSc., Biotecnología, Corporación Académica Ambiental. Microbióloga Industrial y Ambiental. Grupo de investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia (UdeA), Calle 70 #. 52-21, Medellín, Colombia. xiomara.lopezl@udea.edu.co.

López Torres, Jorge, Investigador Titular. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT. Cuba.

## M

Medero Vega, Víctor, Investigador Titular. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT. Cuba.

Mendoza-Puertas, Rodrigo, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

Mesa López, Neftalí, Docente de Planta Facultad de Ciencias. Director Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología Vegetal y Microbiana. GEBIUT. Universidad del Tolima. AA 546 nmesa@ut.edu.co.

Montano Pérez, Nery, Técnico de Investigaciones. Laboratorio de Biotecnología. INIVIT. Cuba.

Móvil, Olga, MSc., Estación Experimental de Padrón, INIA-Miranda, Caucagua, Estado Miranda, Venezuela.

## N

Nápoles J., Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n. Santiago de Cuba. CP 90500. janet@uo.edu.cu.

## O

Ocampo Guerrero, Martha Lily, Docente de Planta Facultad de Ciencias. Investigadora Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología Vegetal y Microbiana. GEBIUT. Universidad del Tolima. AA 546 mlocampo@ut.edu.co.

Oropeza, Maira, PhD Ciencias. Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, Venezuela. maira.oropeza@ciens.ucv.ve.

Ospina, Sonia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. saospinas@unal.edu.co.

## P

Parra, Dercy, MSc., Estación Experimental de Padrón, INIA-Miranda, Caucagua, Estado Miranda, Venezuela.

Pérez Martínez, Belkys Adriana, Ing. de Producción Biotecnológica. Profesional de investigación líder en propagación in vitro. Subdirección Científica. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. baperez@jbb.gov.co

Pérez, R.M., Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n. Santiago de Cuba. CP 90500. rmaria@uo.edu.cu.

## Q

Quevedo García, Enrique. Profesor Asociado MSc. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Agrarias - Departamento de Agronomía. km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. enriquegarcia@unipamplona.edu.co

Quiñones-Galvez, Janet, MSc, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba, jquinones@bioplasmas.cu, janet.quinonesgalvez@gmail.com.

Quirós, Yemeys, Ing., Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba.

## R

Rayas, Aymé, Investigador Auxiliar. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT. Cuba.

Reynaldo Alvarez, Damicela, Técnico de Investigaciones. Laboratorio de Biotecnología. INIVIT. Cuba.

Restrepo Osorio, Jaime, PhD., Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia. jaimerestorepo@correounivalle.edu.co.

Rodríguez, Anar J., M.C., Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, anarodri@ulb.ac.be.

Rodríguez González, Dayana, Lic. en Biología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba. tculture.biotec@inivit.cu.

Rojas, Marcia M., PhD, Profesora Titular, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, mayra@fbio.uh.cu.

Ruiz, Carolina, Microbióloga Industrial, Investigador Profesional, Laboratorio de Control Biológico, Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. jcrui@corpoica.org.co.

## S

Santos Pino, Arletys, Investigador Auxiliar. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. INIVIT. Cuba.

Segura Sánchez, Freimar, MSc., Ciencias Farmacéuticas, PhD Farmacotecnia y Biofarmacia. Grupo de Investigación Biopolimer, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. freimar.segura@udea.edu.co.

Sosa, Daynet, PhD, Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle Sartenejas. Baruta. Caracas, Estado Miranda, Venezuela. Universidad Estatal de Milagro, UNEMI, Milagro; Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil; Guayas, Ecuador (Dirección actual).

Sosa, Maryla, MSc., Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

## T

Trujillo, Reinaldo, PhD., Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, Cuba.

## V

Vélez-Mora, Diego Paúl, Master in Characterization and Conservation of Biodiversity, Departamento de Ciencias Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. P.C. 1101608. San Cayetano Alto, Ecuador. dpvelez@utpl.edu.ec.

Villamizar, Carmen Edilia. Profesor MSc. Universidad de Pamplona, Facultad de Educación. km 1 vía Bucaramanga el Buque, Pamplona, Norte de Santander, Colombia. cevill28@gmail.com.

Villamizar, Laura, PhD, Investigador PhD, Laboratorio de Control Biológico, Corporación Colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. lvillamizar@corpoica.org.co.

## Y

Yapo-Pari, Ursulo, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

## Z

Zambrano, Diana Corina, Microbióloga Industrial, MSc., cPhD., Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo -Instituto Tecnológico de Costa Rica. corina\_zambrano@yahoo.es.

Zambrano, Gregorio, Economista, estudiante Maestría en Economía. Profesional de Apoyo Planeación estratégica, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. gzambrano@corpoica.org.co

Zavala-Rivera, Christian, Laboratorio de Biología Celular, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, Av. Alcides Carrión s/n.

# INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La *Revista Colombiana de Biotecnología* publica únicamente artículos originales, principalmente contribuciones provenientes de investigación y desarrollo en las diversas áreas de la biotecnología, así como artículos técnicos que no presenten prueba de hipótesis, como la descripción técnica de métodos. También serán aceptadas notas breves; por ejemplo informes de un trabajo significativo cuyos objetivos sean de corto alcance.

Los autores deberán seguir las instrucciones que se presentan a continuación. Los artículos que no cumplan con éstas se devolverán sin ser evaluados. Los manuscritos deben enviarse por triplicado, en papel blanco de tamaño carta (21,6 x 27,5 cm), a espacio sencillo, con márgenes de 3 cm. Las dos copias deberán omitir la información de los autores. Debe incluirse la versión electrónica del trabajo en disquete o CD. Para agilizar el proceso de evaluación puede enviarse también una copia al correo electrónico que se indica al final. Los artículos deben ser elaborados utilizando Word Windows o aplicaciones compatibles, en letra Times new roman de 12 puntos.

El trabajo debe tener una extensión máxima de 20 páginas, incluidas figuras, tablas y bibliografía. El lenguaje utilizado debe ser claro y preciso. El trabajo debe estar escrito en estilo impersonal.

Los nombres comerciales y marcas deben evitarse en el texto, o referidos entre paréntesis. Los productos comerciales deben ser mencionados por el nombre técnico o el principio activo. Los nombres registrados deben ir acompañados por ®. Se deben utilizar las abreviaturas aceptadas internacionalmente. En caso de ser utilizadas siglas poco comunes, deberán indicarse completas la primera vez que se citan, seguida de la sigla entre paréntesis. Todas las abreviaturas y siglas deben escribirse sin punto. Use el sistema métrico decimal para todas las medidas y abreviaturas para las unidades comunes de medida: kilogramo (kg), gramo (g), miligramo (mg), metro (m), etc. Evite las notas de pie de página, excepto para la información de los autores del artículo. Utilice un solo tamaño de letra.

La estructura del artículo debe tener en cuenta los pasos del método científico, así:

**Título.** Debe ser corto pero ilustrativo, sin exceder de 15 palabras. Debe incluirse una traducción del título en inglés y un título corto para los encabezados de página.

**Autores.** En el crédito a los autores se deben incluir los nombres completos. Los autores deben ir en orden de acuerdo con la importancia de contribución a la investigación o en la preparación del artículo y no en orden alfabético ni de rango. En nota a pie de página y con asteriscos se indicarán respectivamente los títulos académicos, la institución a la cual pertenecen y la dirección postal completa (incluido e-mail).

**Resumen.** Debe ser conciso y contener información sobre justificación, objetivos, metodología y resultados concretos de la investigación. Debe indicar las principales conclusiones haciendo énfasis en los logros alcanzados. No debe exceder de 250 palabras escritas en un solo párrafo.

**Palabras clave.** Se debe elaborar una lista de cinco palabras del artículo, como máximo, diferentes de las incluidas en el título, que faciliten el uso de los sistemas modernos de catalogación y búsqueda de la información por computador.

**Abstract.** Debe ser una traducción técnica del resumen al idioma inglés.

**Key words.** Debe ser una traducción fiel de las palabras clave al idioma inglés.

**Introducción:** Debe describir el planteamiento general de un tema, dando la información necesaria en forma precisa y haciendo referencia sólo a la bibliografía directamente relacionada y considerada indispensable para el desarrollo del tema, que permita conocer el estado actual del mismo. Debe indicar con claridad el objetivo de la hipótesis de la investigación y su relación con otros trabajos relevantes. (No revisiones amplias de bibliografía).

**Materiales y métodos:** Deben describirse las técnicas y los equipos utilizados dentro de una secuencia que muestre de manera concreta y lógica el desarrollo de la investigación, con el fin de que puedan ser reproducibles. Las fuentes y el estado de pureza de los materiales y la descripción detallada de equipos sólo debe incluirse cuando éstos sean muy específicos o novedosos. Los procedimientos descritos por otros autores deben evitarse, pero si han sido modificados, se deben incluir los detalles de la modificación.

**Resultados y discusión** (la discusión puede ir como capítulo aparte). Los resultados experimentales podrán presentarse en tablas y figuras sólo cuando éstas sean absolutamente necesarias, y deben estar explicadas en forma sucinta pero completa en el texto. En caso de que los resultados estén sustentados por cálculos estadísticos, deberá mencionarse la procedencia de los datos y el método estadístico empleado. Las tablas se deben presentar con título e identificadas con números arábigos continuos. Las figuras, fotografías, dibujos, gráficos y mapas deben presentarse con título e identificarse con números arábigos. Se aceptan figuras elaboradas en computador cuando éstas sean impresas con características de alta calidad, preferentemente en impresora láser. Las fotografías se aceptan en blanco y negro. En caso de ser necesario incluir fotografías en color, el autor paga los costos de su impresión. La discusión debe ser breve y limitarse a los aspectos significativos del trabajo.



**Conclusiones.** Deben basarse en los resultados obtenidos; si es posible, deben ofrecer una solución al problema planteado en la introducción.

**Agradecimientos.** En caso de ser necesario manifestar agradecimientos a las personas o instituciones que contribuyeron de manera significativa a la realización del trabajo, éstos deberán ser muy cortos y concretos.

**Cita bibliográfica.** Solamente se aceptan referencias publicadas, citando el apellido del autor seguido del año de publicación entre paréntesis. Ejemplo: Rodríguez (1997). Cuando los autores sean tres o más se debe usar la expresión latina *et al.* Ejemplo: López *et al.* (1996). Si la cita se coloca al final se usa autor y fecha entre paréntesis: (Rodríguez 1997; López *et al.*, 1996).

**Bibliografía.** Se debe presentar en orden alfabético. Su presentación será de la siguiente manera.

**Artículo.** Autores, año, título del artículo, revista, volumen, número, páginas. Ejemplo: Pérez R., Lalucat J. 1980. Genes asesinos de vida libre. *Investigación y ciencia*. 44 (4): 38-45.

**Libro.** Autor, año de publicación, título, lugar de impresión, editorial o entidad responsable de la publicación, páginas. Ejemplo: Gómez, A; Posada, H. 1987. *Descripción de malezas en plantaciones de café*. Chinchiná, Colombia: Cenicafe, p. 481. Las tesis deben referenciarse como libro. Si algún trabajo tiene características propias y no puede cumplir todas las especificaciones señaladas anteriormente, se recomienda que por lo menos tenga en cuenta título, autor, resumen, palabras clave, traducciones del resumen y palabras clave, citas bibliográficas, conclusiones.

### Artículos de revisión de tema

Los artículos de revisión solamente se aceptarán para publicación cuando sean solicitados por el Consejo Editorial. No obstante, los autores pueden proponer temáticas indicando el objetivo de la revisión, fuentes y métodos de búsqueda de referencias. El Consejo Editorial evaluará las propuestas y determinará si es posible su desarrollo e inclusión en la revista.

Los artículos de revisión, que de acuerdo con Colciencias, son documentos resultado de una investigación donde se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones publicadas o no publicadas sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y las tendencias de desarrollo, deben cumplir con las siguientes características:

Extensión entre 12 y 20 páginas. Componentes: resumen que enfatice en el significado de los hallazgos recientes, introducción, análisis crítico (presentar con subtítulos o secciones), conclusiones y bibliografía que abarque por lo menos 50 referencias, en su mayoría recientes (de los últimos cinco años en el caso de temáticas ampliamente conocidas). Además, se sugiere incluir tablas, esquemas y

figuras que dinamicen el texto y faciliten su comprensión. La revisión debe integrar adecuadamente la información recopilada y explicar con detalle las limitaciones e incongruencias de los resultados de los estudios publicados.

La *Revista Colombiana de Biotecnología* es una publicación arbitrada. Los artículos recibidos son enviados (sin nombres de autores) a pares evaluadores anónimos seleccionados por el Consejo Editorial. Sus observaciones son remitidas a los autores para que realicen las modificaciones correspondientes. El Consejo Editorial toma la decisión final sobre la publicación de los artículos.

### Dirección

Revista Colombiana de Biotecnología  
Consejo Editorial  
Universidad Nacional de Colombia  
Instituto de Biotecnología  
Teléfonos: (571) 316 5450  
316 5000 Ext. 16981 -  
Fax: 3165415  
A.A. 14490 de Bogotá  
e-mail: revcbib\_bog@unal.edu.co  
www.rcb.unal.edu.co

### Ética

#### Declaración de ética y buenas prácticas

El comité editorial de la Revista Colombiana de Biotecnología está comprometido con altos estándares de ética y buenas prácticas en la difusión y transferencia del conocimiento, para garantizar el rigor y la calidad científica. Es por ello que ha adoptado como referencia el Código de Conducta que, para editores de revistas científicas, ha establecido el Comité de Ética de Publicaciones (COPE: Committee on Publication Ethics) dentro de los cuales se destaca:

#### Obligaciones y responsabilidades generales del equipo editorial

- Relaciones con los lectores
- Relaciones con los autores
- Relaciones con los evaluadores
- Proceso de evaluación por pares
- Reclamaciones
- Fomento de la integridad académica
- Protección de datos individuales
- Seguimiento de malas prácticas
- Integridad y rigor académico

Más información:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/about/editorialPolicies#custom-0>

# AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA

The *Revista Colombiana de Biotecnología* only publishes original articles, mainly contributions from research and development (R&D) in biotechnology's diverse areas, as well as technical articles not necessarily orientated towards proving hypotheses (i.e. technical descriptions of methods). Brief notes will also be accepted, such as reports concerning significant work having short-term objectives.

Authors must follow the following instructions; articles not complying with them will be returned without being evaluated. Manuscripts must be submitted in triplicate, on letter-sized (21.6 x 27.5 cm), white paper; they must be single-spaced, with 3 cm margins. Two copies must omit author details. An electronic copy of the work must also be submitted on diskette or CD. A copy can also be sent to the e-mail address given at the end of these instructions to speed-up the evaluation process. The articles must be processed using Word for Windows or a compatible application, written in Times New Roman, font-size 12.

The work must not exceed a maximum of 20 pages, including Figures, Tables and Bibliography. The language used must be clear and precise and the work must be written in the third person. The past tense must be used for the Introduction, Materials and Methods and Results sections.

Commercial names and brand-names must be avoided in the body of the text (or referred to in parenthesis). Commercial products must be referred to by the technical name or the main ingredient (initial letter capitalised). Only internationally accepted abbreviations must be used. In the case of little-known acronyms being used, they must be written in full the first time that they are used, followed by the acronym in parenthesis. All acronyms and abbreviations must be written without a full-stop following them. The metric decimal system must be used for all measurements and those abbreviations for common units of measurement: kilogram (kg), gram (g), milligram (mg), meter (m), etc. Avoid footnotes, except for information regarding authors of an article. Use a single letter size.

The article's structure must follow the accepted steps used by Scientific Method, thus:

**Title.** It must be short but illustrative, without exceeding 15 words. This title must then be translated into Spanish and a short title for the pageheadings must also be included.

**Authors.** The complete names must be included when crediting the authors of any article. The authors must be listed in agreement with the importance of their contribution to the research or in the preparation of the article and not in alphabetical order, nor in terms of rank. Their respective academic distinctions, the institution to which they belong and their complete mailing address (including e-mail) must be marked by an asterisk and given in a footnote.

**Abstract in English.** This must be concise and contain information concerning the research's justification, objectives, methodology and concrete results. It must indicate the main conclusions, emphasising achievements. It must not exceed 250 words, these to be written in a single paragraph.

**Key words in English.** There must be a list containing a maximum of five key words from the article (different to those included in the title) facilitating the use of modern computerised cataloguing and information search systems.

**Abstract in Spanish.** This must be a technical translation of the abstract to the Spanish language.

**Key words in Spanish.** There must be a faithful translation of the key words to the Spanish language.

**Introduction.** This must describe the general purpose for writing on the subject, giving the necessary information precisely, referring only directly to that related literature considered indispensable for developing the subject, allowing the present state of the same to become known. It must clearly indicate the objective of the research's hypothesis and its relationship with other relevant work (it must not include extensive reviews of the bibliography).

**Materials and Methods.** The techniques and the equipment used must be described in a sequence specifically and logically showing the research's development so that they can be reproduced. The materials' sources, their state of purity and the detailed description of equipment must only be included when these are very specific or novel. Procedures described by other authors must be avoided; but, if they have been modified, then the details of such modification must be included.

**Results and Discussion** (the Discussion can be given as a separate section). Experimental results must only appear in Tables and Figures when these are absolutely necessary; they must be succinctly but completely explained in the text. When results are sustained by statistical calculation, the origin of the data and the statistical method used must be mentioned. The Tables must be given a title and be identified by continuous Arabic numbers. The Figures (photographs, drawings, graphs and maps) must appear with a title and be identified by Arabic numbers. Figures processed by computer (when these are printed with high quality characteristics, preferably by laser printer) are accepted. Black and white photographs are accepted. If it is necessary to include colour photographs then the author must pay the printing costs. The discussion must be brief and limited to the work's significant aspects.

**Conclusions.** They must be based on the results obtained. If it is possible, they must offer a solution to the problem outlined in the Introduction.

**Acknowledgements.** If it is necessary to show gratitude to people or institutions making a significant contribution towards the work, these must be kept short and concrete.

Bibliographical references in the body of the **Text**. Only published references can be accepted, mentioning the author's last name, followed by the year of publication in parenthesis, for example: Rodríguez (1997). When there are three or more authors, the Latin expression *et al.* must be used, for example: López *et al.* (1996). If the reference is made at the end of a phrase, author and date are given in parenthesis, for example: (Rodríguez 1997; López *et al.* 1996).

**Bibliography.** This must be presented in alphabetical order of first-named authors. Its presentation must be as follows.

**For articles.** Author(s), year, title of the article, journal, volume, number, page(s), i.e. Pérez, R.; Lalucat, J. 1980. Genes as assassins of free life. 44 (4): 38-45.

**Books.** Author (s), year of publication, title, place where printed, the publisher or organisation responsible for the publication, pages, i.e. Gómez A.; Posada, H. 1987. Chinchiná, Colombia: Cenicafé.p. 481.

A thesis must be referred to as if it were a book.

If any work has special characteristics and therefore cannot fulfil all those specifications previously indicated, then it is recommended that at least title, author(s), abstract, key words, translations of the abstract and key words, bibliographical appointments and conclusions should be given.

#### Articles dealing with topic review

Topic review articles will only be accepted for publication when requested by the Editorial Committee. Authors may however propose topics, indicating the purpose of such reviews and the reference sources and search methods to be used. The Editorial Committee will evaluate any such proposal and determine whether it should be developed and/or included in the journal.

According to Colciencias, review articles are documents resulting from research, analysing, systematising and integrating the results of published and unpublished research in a scientific or technological field so as to take account of advances and trends in R&D. They must fulfil the following characteristics.

Reviews must be between 12 and 20 pages long. Contents: they must have a Summary emphasising the significance of recent findings; an Introduction; a section for Critical Analysis (presented under subtitles or in sections); Conclusions; and a Bibliography, including at least 50 references, the majority being recent (i.e. published within the last five years in the case of wellknown topics). Schemes, Figures and Tables

should also be included, dynamising the text and facilitating understanding. A review should integrate the compiled information and give a detailed explanation of the limitations and any incongruence found in published studies' results.

The *Revista Colombiana de Biotecnología* is a peer-reviewed publication. Those articles received are sent (without authors' names) to anonymous peerevaluators selected by the Editorial Committee. Their observations are then sent to authors so that they can make the corresponding modifications. The Editorial Committee takes the final decision whether to publish a particular article.

#### Address

Revista Colombiana de Biotecnología  
Consejo Editorial  
Universidad Nacional de Colombia,  
Instituto de Biotecnología  
Telephones: (571) 316 5450  
316 5000 Ext. 16981  
Fax: 3165415  
A.A. 14490 de Bogotá (P.O. Box)  
e-mail: revcbib\_bog@unal.edu.co  
www.rcb.unal.edu.co

#### Ethics

##### Scope and policy

The editorial committee of the Colombian Journal of Biotechnology is committed to high standards of ethics and good practice in the dissemination and transfer of knowledge, to ensure scientific rigor and quality. That is why it has taken as reference the Code of Conduct for editors of scientific journals, has established the Ethics Committee Publications (COPE: Committee on Publication Ethics) within which it stands:

##### Statement of Ethics and Good Practice

- General duties and responsibilities of Editors
- Relations with readers
- Relations with authors
- Relations with reviewers
- The peer-review process
- Complaints
- Encouraging academic integrity
- Protecting individual data
- Ensuring the integrity of the academic record

##### More information:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/about/editorialPolicies#custom-0>



**Volumen XVII, número 2, julio - diciembre de 2015**

ISSN 0123-3475 (impreso) ~ E-ISSN 1909-8758 (en línea)

Título abreviado (en línea) rev.colomb.biotecnol.

www.rcb.unal.edu.co

© Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá,  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

*La Revista Colombiana de Biotecnología* inicia su periodicidad semestral en el primer semestre de 1997, siendo un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, avances en legislación, política y normatividad, tendencias de mercado, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Colombia como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes actores de la biotecnología.



**Atribución: Atribución – No comercial – Compartir igual:** Esta licencia permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de tu obra de modo no comercial, siempre y cuando le den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

**Rector Universidad Nacional de Colombia**

Ignacio Mantilla Prada

**Vicerrector Universidad Nacional de Colombia**

Diego Fernando Hernández Losada

**Vicerrector de Investigación Universidad Nacional de Colombia**

Dolly Montoya Castaño

**Decano Facultad de Ciencias (e)**

Jaime Aguirre Ceballos

**Editor de la revista**

Dolly Montoya Castaño, PhD

(Doctora en Ciencias de la Vida)

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

**Contacto e información**

Jaqueline Ramírez P.

Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional de Colombia

Carrera 30 No. 45-03, Ed. Manuel Ancizar (224),

Código postal: 14490. Bogotá D. C., Colombia

Teléfono: (57-1) 316 5000, ext. 16981

Telefax: (57-1) 316 5415 e-mail: revcbib\_bog@unal.edu.co

**Canje**

Dirección de Bibliotecas. Grupo de Colecciones

Hemeroteca Nacional Carlos Lleras Restrepo

Av. El Dorado No. 44A-40,

Bogotá, D. C., Colombia

Telefax: 316 5000, ext. 20082. a. a. 14490

Correo electrónico: canjednb\_nal@unal.edu.co

**Suscripciones:**

Consignar la suma de \$30.000 equivalente a la suscripción anual (dos números) en la cuenta No. 209-849037-97 de Bancolombia a nombre de Corpodib-Revista Colombiana de Biotecnología.

Enviar al Fax (571) 316 5415 o por correo al Instituto Colombiano de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (AA. 14490 de Bogotá), copia de la consignación y sus datos completos (nombre, entidad, cargo, dirección para el envío, ciudad, país, teléfono, fax, e-mail).

