

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

Tercer Premio del Concurso de fotografía en Micro y Nanociencias, realizado por el SENA, Tecnoparque nodo Medellín.

**Nombre de la Obra:**  
"Microtubulos Fluorescentes"

**Descripción de la obra:**  
Descripción de la obra: Preservación y fijación de elementos celulares: microtubulos acetilados en verde, mitocondrias en rojo y núcleo en azul de la línea celular Vero.

**Autor:**  
Hamlet Adolfo Acevedo Ospina  
**Lugar:** Universidad de Antioquia  
**Correo:** hamletarg@gmail.com

**Técnica Utilizada:**  
Microscopia de fluorescencia

**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.snsf.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)

La Revista Colombiana de Biotecnología es una publicación interinstitucional, especializada en la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, así como otros temas relacionados con las diversas áreas de la biotecnología.

**Corrección de estilo y diagramación**  
Dora Álvarez S.

**Impresión**  
Fundación Cultural Javeriana de Artes Gráficas  
Javegraf

**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

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.

**Suscripciones, envío de trabajos, canjes o comentarios:**  
 Instituto de Biotecnología /Universidad Nacional de Colombia.  
 Ciudad Universitaria. Edificio Manuel Ancizar.  
 A.A. 14490 de Bogotá. Tel. [5-71] 316-5450 / 316-5000 (ext. 16981) - Fax: [5-71] 316-5415  
 Correo electrónico: revcbib\_bog@unal.edu.co

## CONTENIDO

### EDITORIAL

Alimentos funcionales y biotecnología  
*Andrés Illanes* ..... 5

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

|   |     |
|---|-----|
| Identificación, establecimiento <i>in vitro</i> y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame ( <i>Dioscorea spp.</i> ) empleadas con fines medicinales<br><i>Ramos D. Víctor Andrés, Bustamante, R. Silvia Lizette, Rincón Velandia, Javier, Rojas Cardozo, Maritza Adelina, Raz, Lauren, Buitrago Hurtado, Gustavo</i> ..... | 9   |
| Efecto de la carga orgánica de la gallinaza de jaula en el potencial de biometanización<br><i>Marin-Batista Jose, Castro Liliana, Escalante Humberto</i> .....  | 18  |
| Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila ( <i>Aloe barbadensis</i> Mill.)<br><i>Nilca Rosa Albany de Vilchez, Jorge Alberto Vilchez Perozo, Silvia León de Sierralta, Alba Ruth Nava Ferreira, Leonardo Javier Martínez Ferrer y Miguel Ángel Molina Pulgar</i> .....                                   | 24  |
| Optimización de la conservación <i>in vitro</i> de germoplasma de <i>Dioscorea spp</i> por crecimiento mínimo<br><i>Lucía Candelaria Díaz Narváez, Oscar Elías Carmona Wilches, Javier Darío Beltrán Herrera</i> .....  | 32  |
| Viabilidad de una bacteria láctica encapsulada e incorporada en una matriz de cobertura de chocolate<br><i>Estefania Garcia Gonzalez, Liliana Serna Cock</i> .....  | 40  |
| Caracterización molecular con microsátélites amplificados al azar (RAMs) de Inchi ( <i>Caryodendron orinocense</i> K.)<br><i>Ana Cruz Morillo-Coronado, Liseth Gómez-Beltrán, Iván A. Ávila-Morales, Ernesto Andrade, Yacenia Morillo-Coronado</i> .....  | 46  |
| Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de <i>Rhizomucor spp</i><br><i>Osmar T. Morillo Piña, Pablo J. García Lugo, Balmore Ruizdael Guerrero Cardena, Yzolet Torres Vielma, Rafael F. Castañeda Ruiz</i> .....   | 54  |
| Variabilidad interspecífica de duraznos ( <i>Prunus pérsica</i> L. Batsch.) y ciruelos ( <i>Prunus domestica</i> ) usando RAMs<br><i>Ana Cruz Morillo C., Yacenia Morillo C., Leonardo González M., Iván Adiel A.</i> .....   | 61  |
| Micropropagación de plantas de lechosa en recipientes de inmersión temporal a partir de brotes axilares<br><i>Ariadne Vegas García, Yanet Sandrea, Ohitza González, Andy Díaz, José Gerardo Albarran, Alexandra Schmidt, Efraín Salazar, Yris Mujica, Raúl Casado, José Fernández, Carlos Marín R.</i> .....                                      | 70  |
| Diseño mecánico de un exoesqueleto para rehabilitación de miembro superior<br><i>Juan Francisco Ayala-Lozano, Guillermo Urriolagoitia-Sosa, Beatriz Romero-Angeles, Christopher René Torres-San Miguel, Luis Antonio Aguilar-Pérez, Guillermo Manuel Urriolagoitia-Calderón</i> .....   | 79  |
| Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> de exudados foliares de tabaco contra dos bacterias fitopatógenas<br><i>Yanelis Capdesuñer Ruiz, Maribel Rivas Paneca, Erinelvis Rodríguez Hernández, Madelín Gallo Rodríguez, Janet Quiñones Galvez, Ermis Yanes Paz, Martha Hernández de la Torre</i> ..  | 91  |
| Obtención de semilla biotecnológica de caña de azúcar ( <i>Saccharum spp.</i> híbrido) de alta calidad genética y fitosanitaria en el Ecuador<br><i>Ana C. Arellano-Litardo, Sofía B. Korneva, Fanny C. Fischer, Nataly A. Tola, Miguel Ramos-Lealy Astolfo Pincay-Flores</i> .....   | 101 |
| Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por <i>Streptomyces spp.</i> y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A<br><i>Gloria Carolina Prieto-Correal, Luis Daniel Prada-Salcedo', Claudia Liliana Cuervo Patiño, Marcela Franco- Correa</i> .....  | 111 |

## ARTÍCULOS CORTOS

|   |     |
|---|-----|
| Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton ( <i>Dichantium aristatum</i> )<br>Cecilia Lara Mantilla, Jorge Luis Negrete Peñata .....  | 122 |
| Proceder de la innovación en la industria farmacéutica. El caso de España<br>Aída Salazar García; Elicet Cruz Jiménez; Joaquim Lloveras Macia;<br>Guillermo Urriolagoitia Calderón .....  | 131 |
| Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> (Spirulina) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales en el sur del Perú<br>Ronald Huarachi-Olivera, Úrsulo Yapo-Pari, Alex Dueñas-Gonza, José Condori-Huamanga,<br>D.G. Pacheco-Salazar, Joe Soto-Flores ..... | 142 |
| INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES .....  | 153 |

## CONTENIDO

### EDITORIAL

|  |   |
|--|---|
| Functional foods and biotechnology<br>Andrés Illanes ..... | 5 |
|--|---|

### RESEARCH ARTICLES

|   |    |
|---|----|
| Identification, <i>in vitro</i> establishment and preliminary phytochemical analysis of wild yam ( <i>Dioscorea spp.</i> ) used for medicinal purposes<br>Ramos D. Víctor Andrés, Bustamante, R. Silvia Lizette, Rincón Velandia, Javier,<br>Rojas Cardozo, Maritza Adelina, Raz, Lauren, Buitrago Hurtado, Gustavo ..... | 9  |
| Effect of chicken manure organic load on biomethane potential<br>Marin-Batista Jose, Castro Liliana, Escalante Humberto .....   | 18 |
| Liquid medium culture: an approach for the commercial micropropagation of aloe ( <i>Aloe barbadensis</i> Mill.)<br>Nilca Rosa Albany de Vilchez, Jorge Alberto Vilchez Perozo, Silvia León de Sierralta,<br>Alba Ruth Nava Fereira, Leonardo Javier Martínez Ferrer y Miguel Ángel Molina Pulgar .....                    | 24 |
| Optimization of <i>in vitro</i> conservation of <i>Dioscorea spp</i> germplasm by minimal growth<br>Lucía Candelaria Díaz Narváez, Oscar Elías Carmona Wilches,<br>Javier Darío Beltrán Herrera .....   | 32 |
| Viability of encapsulated lactic bacteria added in a matrix of chocolate coverage<br>Estefania García Gonzalez, Liliana Serna Cock .....  | 40 |
| Molecular characterization with random amplified microsatellites (RAMs) of Inchi ( <i>Caryodendron orinocense</i> K.)<br>Ana Cruz Morillo-Coronado, Liseth Gómez-Beltrán, Iván A. Ávila-Morales,<br>Ernesto Andrade, Yacenia Morillo-Coronado .....   | 46 |
| Evaluation of experimental production of milk-clotting enzymes using <i>Rhizomucor spp</i> strains<br>Osmar T. Morillo Piña, Pablo J. García Lugo, Balmore Ruizdael Guerrero Cardena,<br>Yzoleth Torres Vielma, Rafael F. Castañeda Ruiz .....  | 54 |
| Intraespecific variability of peach ( <i>Prunus persica</i> L. Batsch.) and plums ( <i>Prunus domestica</i> ) using RAMs<br>Ana Cruz Morillo C., Yacenia Morillo C., Leonardo González M., Iván Adiel A. ....   | 61 |
| Micropropagation of papaya plants in temporary immersion recipients from axillary shoots<br>Ariadne Vegas García, Yanet Sandra, Ohitza González, Andy Díaz,<br>José Gerardo Albarrán, Alexandra Schmidt, Efraín Salazar, Yris Mujica, Raúl Casado,<br>José Fernández, Carlos Marín R. ....                                | 70 |
| Mechanical design of an exoskeleton for upper limb rehabilitation<br>Juan Francisco Ayala-Lozano, Guillermo Urriolagoitia-Sosa, Beatriz Romero-Angeles,<br>Christopher René Torres-San Miguel, Luis Antonio Aguilar-Pérez,<br>Guillermo Manuel Urriolagoitia-Calderón .....   | 79 |
| <i>In vitro</i> antibacterial effect of tobacco leaf exudates against two bacterial plant pathogens<br>Yanelis Capdesuñer Ruiz, Maribel Rivas Paneca, Erinelvis Rodríguez Hernández,<br>Madelín Gallo Rodríguez, Janet Quiñones Galvez, Ermis Yanes Paz,<br>Martha Hernández de la Torre .....                            | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| Obtainment of sugarcane ( <i>Saccharum</i> spp. hybrid) biotechnological seed of high genetic and phytosanitary quality in Ecuador<br><i>Ana C. Arellano-Litardo, Sofía B. Korneva, Fanny C. Fischer, Nataly A. Tola, Miguel Ramos-Leal y Astolfo Pincay-Flores</i> .....                         | 101 |
| Evaluation of organic acid production by <i>Streptomyces</i> spp. and solubilization of three phosphorus sources by strain T3A<br><i>Gloria Carolina Prieto-Correal, Luis Daniel Prada-Salcedo, Claudia Liliana Cuervo Patiño, Marcela Franco- Correa</i> .....                                   | 111 |
| <b>SHORT ARTICLES</b>   |     |
| Effect of bio-inoculant from microbial consortia phosphate solubilizing natives in development of pastures ( <i>Dichanthium aristatum</i> )<br><i>Cecilia Lara Mantilla, Jorge Luis Negrete Peñata</i> .....  | 122 |
| Proceed to the innovation in the pharmaceutical industry. The case of Spain<br><i>Aída Salazar García; Elicet Cruz Jiménez; Joaquim Lloveras Macia; Guillermo Urriolagoitia Calderón</i> .....  | 131 |
| Cultivation of <i>Arthrospira platensis</i> (Spirulina) in curved doubly tubular photobioreactor to environmental conditions in the South of the Peru<br><i>Ronald Huarachi-Olivera, Úrsulo Yapo-Pari, Alex Dueñas-Gonza, José Condori-Huamanga, D.G. Pacheco-Salazar*, Joe Soto-Flores</i> ..... | 142 |
| AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA .....   | 155 |

# Alimentos funcionales y biotecnología

## Functional foods and biotechnology

*Andrés Illanes\**

---

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50997

El estilo de vida contemporáneo provoca un fuerte impacto en los hábitos alimentarios, con un consumo creciente de alimentos procesados y comidas rápidas cuyos efectos adversos sobre la salud son claramente perceptibles. La comida en el mundo occidental está asociada al placer, de modo que el compromiso entre la gratificación y la salud es un dilema en nuestra sociedad. Los problemas de salud asociados a hábitos alimentarios: diabetes, cáncer, fallas cardíacas, alergias y obesidad, afectan por igual a adultos y niños y tienen un profundo impacto en países en vías de desarrollo donde los efectos nocivos resultan más evidentes que en países desarrollados debido a las limitaciones económicas (Ezzati et al., 2005).

Es en este contexto han surgido los alimentos funcionales como aquellos que proveen beneficios a las salud más allá de su función nutricional, por lo que se les denomina también alimentos saludables. Este tipo de alimentos tiene una larga tradición en países orientales donde muchos alimentos tradicionales han sido reconocidos como promotores de la salud. El término alimento funcional fue acuñado en Japón en la década de 1980 y en 1991 el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de dicho país definió un conjunto de normas para la denominación de una categoría especial de alimentos promotores de la salud, denominados FOSHU (alimentos para usos específicos en salud). Tal concepto se refiere a alimentos que contienen ingredientes con funciones saludables para los cuales se aprueba que declaren sus efectos fisiológicos en los consumidores. Intentando una mayor precisión, los alimentos son considerados funcionales si, más allá de su efecto nutricional, favorecen una o más funciones fisiológicas en el cuerpo humano, mejorando la condición física general y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Un aspecto esencial es que la cantidad y forma de consumo debe ser la habitual en la dieta, por lo que el alimento funcional es ante todo un alimento y no un fármaco. No obstante, los alimentos funcionales pueden contribuir a la prevención y tratamiento de enfermedades en cuyo caso se les denomina nutraceuticos. Es claro que las tendencias de nuestra sociedad contemporánea y la evolución demográfica aconsejan el consumo de alimentos funcionales, lo que hoy puede considerarse una tendencia sostenible a nivel mundial y no una moda pasajera, según lo avala el creciente número de ellos que ingresan al mercado consumidor cada año (Bigliardi y Galati, 2013). La gran relevancia que han adquirido los alimentos funcionales queda claramente establecida en una reciente publicación (Boye, 2015) que trata de manera exhaustiva el tema dando especial énfasis en los desarrollos y desafíos tecnológicos

Existe una conciencia creciente entre los consumidores de la importancia de la dieta en el estado de salud, lo que se ve acentuado por el envejecimiento de la población y el incremento de la expectativa de vida, fenómeno que no es patrimonio de los países desarrollados y que se observa también claramente en los países de nuestra América Latina. Este escenario genera a la vez una gran oportunidad y un gran desafío para la industria alimentaria sobre la cual recae la responsabilidad de responder a la creciente demanda por alimentos funcionales. La industria alimentaria no es considerada un sector de gran dinámica en investigación y desarrollo, de modo que los alimentos funcionales representan para el sector una importante palanca de desarrollo; en efecto, una parte significativa de la evolución experimentada por la industria alimentaria está ligada al desarrollo y sustitución de productos basado en consideraciones nutricionales y de salud y al cumplimiento de las disposiciones que los regulan (Annunziata y Vecchio, 2011).

Los alimentos funcionales pueden ser alimentos naturales, alimentos a los que se les ha adicionado, removido o modificado algún componente o a los que se les ha modificado la biodisponibilidad de alguno de ellos. Un claro ejemplo de alimento funcional es la leche deslactosada en la cual la lactosa ha sido

---

\* MSc., Escuela de Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. aillanes@ucv.cl

removida mediante su conversión enzimática a glucosa y galactosa permitiendo el consumo de leche a personas intolerantes a lactosa, fenómeno que afecta a una parte significativa de la población en nuestros países latinoamericanos. Inicialmente los alimentos funcionales se referían principalmente a la fortificación con vitaminas y minerales; más tarde la fortificación con nutrientes como fibra soluble, fitoesteroles y ácidos grasos omega-3 ganó en importancia (Siró *et al.*, 2008); actualmente son muchos los productos en el mercado considerados alimentos funcionales.

Un aspecto crucial en alimentos funcionales es la reglamentación y declaración sobre sus efectos saludables, lo que varía significativamente de un país a otro. En la Unión Europea el énfasis está en las regulaciones en cuanto a seguridad de consumo, mientras que en Estados Unidos de Norteamérica se da especial relevancia a la declaración de sus efectos. Este problema no es trivial, ya que si bien estos alimentos o sus componentes pueden aliviar o prevenir enfermedades, por lo general no existe evidencia científica suficiente para identificar el ingrediente efectivo y substanciar su eficacia y seguridad de uso. Al no haber una rigurosa regulación sobre alimentos funcionales en muchos países resulta entonces difícil poder determinar la validez científica de la declaración de los efectos saludables (El Sohaimy, 2012).

La aceptación por parte del consumidor es un aspecto clave en los alimentos funcionales, los que en general no son percibidos como una categoría separada de los alimentos naturales, lo que resulta favorable; sin embargo, la aceptación no es incondicional y la apariencia y calidad del producto, así como la claridad de su declaración, son aspectos importantes en su aceptación. Se ha señalado que el nivel educacional, el origen geográfico y el género son variables en relación a la percepción y que la actitud de médicos y dietistas es importante (Cha *et al.*, 2010).

Una parte importante de los alimentos saludables actualmente en el mercado se vinculan a la industria láctea, siendo también destacables los rubros panadería, alimentos infantiles, confites y refrescos. Una parte significativa de los alimentos funcionales apuntan a promover la salud intestinal, que es una determinante muy importante de la salud general. Por ello, dentro de los alimentos funcionales, los probióticos y prebióticos adquieren especial relevancia.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de Naciones Unidas han definido los probióticos como: "microorganismos vivos que, administrados en dosis adecuadas, confieren beneficios en salud al hospedero". Muchos microorganismos son potencialmente probióticos, pero tal condición está principalmente asociada a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Los requisitos para que un microorganismo sea considerado probiótico son su supervivencia en su paso por el tracto gastrointestinal y la comprobación científica de los beneficios en salud que confiere a su hospedero. Debe ser comprobadamente no patógeno, estable genética y fisiológicamente en su lugar de acción y durante todo el proceso de su elaboración y almacenamiento en la matriz alimentaria que lo contiene, y ser su proceso de producción escalable a nivel industrial. Diversos beneficios han sido declarados para los probióticos, la mayor parte de ellos referidos a salud intestinal: alivio de intolerancia a la lactosa y síndrome de colon irritable, prevención y reducción de diarreas, reducción de riesgos de cáncer intestinal, reducción del colesterol sanguíneo, estimulación de respuesta inmune e inhibición de patógenos del tracto gastrointestinal, entre otros (Vasiljevic y Sha, 2008). No obstante, se trata en su mayor parte de estudios considerados preliminares en la medida que aún resta mucho por conocer respecto a los mecanismos de acción de los probióticos, los que han sido planteados principalmente en base a estudios *in-vitro* cuya predictibilidad de acción *in-vivo* es discutible. Los prebióticos actúan principalmente a nivel intestinal, aunque se ha observado en algunos casos efectos benéficos a nivel sistémico (Kellow *et al.*, 2014).

La correcta dosificación y frecuencia de consumo es quizás el aspecto menos claro en el uso de prebióticos; la dosis recomendada debería basarse en estudios de eficacia en humanos, pero ésta depende de muchos factores cuyo efecto es difícil de determinar o predecir. A pesar de ello, del insuficiente conocimiento sobre mecanismos de acción, de la insuficiente documentación sobre los efectos saludables provocados y de la escasa claridad sobre aspectos regulatorios, el mercado de los probióticos experimenta un crecimiento acelerado en sincronía con la tendencia mundial hacia una alimentación saludable, lo que se ve amplificado por su creciente uso en alimentación de animales domésticos y de crianza.

El desarrollo de los probióticos ha estado fuertemente impulsado por los avances en biotecnología. Nuevas cepas probióticas aisladas de nichos naturales y probióticos producidos por organismos genéticamente manipulados (GMO) han ampliado el espectro de organismos con propiedades probióticas mejoradas para su incorporación en alimentos funcionales. El uso de GMO ha sido hasta ahora escaso debido a la reticencia de los consumidores, quienes en principio están dispuestos al uso de GMO para el tratamiento de enfermedades severas, pero difícilmente para su uso como promotores de salud (Gupta *et al.*, 2014). Como en otras situaciones, tal reticencia debería ir gradualmente disminuyendo en la medida que la seguridad del consumo esté sólidamente sustentada. Por otra parte, los avances en el conocimiento de los mecanismos de acción probiótica y la dinámica de poblaciones a nivel intestinal está fuertemente vinculado a técnicas desarrolladas en biotecnología como la amplificación génica mediante PCR, la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Los prebióticos han sido definidos como ingredientes alimentarios no digeribles que provocan cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo bienestar y salud al hospedero (Roberfroid, 2007). El Grupo Experto en Prebióticos del International Life Sciences Institute (ILSI) europeo se ha hecho eco de tal propuesta definiendo la acción prebiótica como la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de especies microbianas en la microbiota intestinal que confieren bienestar y salud al hospedero (Roberfroid *et al.*, 2010). El efecto del prebiótico es indirecto pues no es el compuesto en sí sino el efecto que provoca en la microbiota intestinal quien confiere bienestar y salud. Los prebióticos estimulan la población microbiana endógena mientras los probióticos implican la adición de especies microbianas exógenas. En tal sentido, es esperable que los prebióticos resulten más efectivos y su acción resulte más predecible que los probióticos, cuyo destino en su paso por el tracto gastrointestinal y su implantación en el colon agrega incertidumbre respecto de su eficacia.

Diversos efectos fisiológicos vinculados a la salud han sido asociados a los prebióticos: mejora y estabilización de la microbiota intestinal; mejora de la función intestinal; reducción de bacterias patógenas; reducción de endotoxinas metabólicas; aumento de la absorción de minerales; mejora de la morfología de la mucosa intestinal debido a la promoción de síntesis de mucina; estimulación de la síntesis de antibióticos; alivio del síndrome de colon irritable; control de la sensación de apetito y del peso corporal; reducción de riesgos de cáncer de colon y diabetes tipo 2; efecto antiinflamatorio; modulación de la ansiedad y la depresión (McFarlane *et al.* 2008). Los criterios aceptados para considerar un ingrediente alimentario como prebiótico son la resistencia a la degradación por ácidos y enzimas en su paso por el tracto gastrointestinal, la fermentabilidad por la microbiota del colon, la estimulación selectiva de bacterias colónicas benéficas y la estabilidad funcional en las condiciones de procesamiento y almacenamiento de la matriz alimentaria que lo contiene. La fermentación selectiva por la microbiota del colon es el criterio más riguroso y difícil de probar concluyentemente (Rastall y Gibson, 2015).

Existen muchas sustancias que pueden ser consideradas prebióticas; sin embargo, la mayor parte de ellas son oligosacáridos no digeribles (OND). Sus efectos prebióticos dicen relación principalmente con la estimulación de la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que reducen la microbiota patógena y estimulan selectivamente la población de bacterias probióticas (principalmente bifidobacterias y también lactobacilos) al disminuir el pH intestinal. No obstante, hay efectos específicos asociados a estos SCFA, como el efecto del propionato en la reducción de la síntesis de colesterol y deposición de tejido adiposo, que se ha asociado a la depresión de la sensación de apetito y de la obesidad, y del butirato considerado un regulador de la homeostasis intestinal. Entre los OND, aquellos propiamente considerados como prebióticos en base a evidencias científicas robustas son los fructanos: inulina y fructo-oligosacáridos (FOS), y los galactanos: galacto-oligosacáridos (GOS) y lactulosa. Otros OND candidatos que satisfacen algunos pero no todos los criterios para ser considerados prebióticos son los isomalto-oligosacáridos (IMOS), los xilo-oligosacáridos (XOS), los oligosacáridos de soya (SOS) y los gluco-oligosacáridos (GIOS). Aunque probablemente no es el prebiótico más eficaz, la inulina es la más empleada en la formulación de alimentos funcionales, proporcionando además propiedades texturales y reológicas a la matriz alimentaria que la contiene (Karimi *et al.*, 2015).

El aporte de la biotecnología a la producción de prebióticos es notable. Aparte de la inulina, polímero de fructosa producido por extracción de productos naturales (achicoria principalmente), los restantes prebióticos son producidos por bioprocesos en que intervienen microorganismos o enzimas específicamente condicionadas para una síntesis eficiente de los OND. Los FOS, son OND conformados por unidades de fructosa (usualmente entre 2 y 6) unidas a una glucosa terminal; son obtenidos por hidrólisis enzimática controlada de la inulina o por síntesis a partir de sacarosa mediante glucosil transferasas solubles o inmovilizadas, o células ricas en dicha actividad (Dominguez *et al.*, 2014). Los GOS son OND conformados por unidades de galactosa (entre 2 y 5 usualmente) unidas a una glucosa terminal; son obtenidos por transgalactosilación de lactosa mediante  $\beta$ -galactosidasas en una reacción cinéticamente controlada en que la lactosa actúa como donador y receptor de los grupos galactosilo. El proceso es particularmente atractivo pues emplea lactosa como único sustrato, la que puede ser obtenida a muy bajo precio como subproducto de la elaboración de queso y una enzima de bajo costo y ampliamente utilizada por la industria alimentaria en la hidrólisis de lactosa en leche y productos lácteos. En este caso la  $\beta$ -galactosidasa no se utiliza en su potencial de hidrólisis (ruptura del enlace  $\beta$ -1,4 de la lactosa) sino en su potencial de síntesis (formación de enlaces del tipo  $\beta$ -1,4 o similares). Ello requiere deprimir la actividad de agua del sistema, lo que se logra trabajando a muy elevadas concentraciones de lactosa (Vera *et al.*, 2012). Los GOS tienen especial aplicación como componente funcional en productos lácteos, destacando su uso en leches especiales para lactantes alimentados con fórmulas en base a leche bovina, donde representan

un componente esencial como inmunoestimulantes, dado que su contenido en leche humana es elevado y cumple dicho rol esencial mientras en leche bovina es muy bajo. Siendo los alimentos lácteos los principales productos para su funcionalización mediante la adición de prebióticos, los GOS resultan particularmente atractivos en una concepción industrial, pues el proceso completo se circunscribe a un mismo tipo de industria. Adicionalmente los GOS son OND muy estables térmicamente y frente al pH lo que asegura su integridad durante el procesamiento del alimento y consumo hasta su lugar de acción en el colon.

Los alimentos funcionales representan hoy en día una tendencia sólidamente asentada hacia la alimentación saludable en respuesta a los hábitos alimentarios erróneos a los que incita el modo de vida contemporáneo. El consumo de alimentos funcionales ya no es más una sofisticación propia de los países más desarrollados; por el contrario, la tendencia a su consumo en nuestros países de América Latina ha experimentado un aumento notable que, con el aporte de la biotecnología, debería redundar en productos de mayor calidad y menor costo, contribuyendo a la integración social respecto de la alimentación. Son muchas las opciones para investigación y desarrollo en el área, las que deben ser recogidas por nuestros investigadores como un modelo muy propicio para dar valor agregado significativo a nuestras materias primas en las que son tan pródigos nuestros países.

## Referencias bibliográficas

- Annunziata A., Vecchio R. (2011). Functional foods development in the European market: a consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3, 223-228.
- Bigliardi B., Galati F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 31, 118-129.
- Boye J. I. (2015). *Nutraceutical and Functional Food Processing Technology*. Wiley Blackwell, Oxford.
- Cha M.H., Lee J., Song M. J. (2010). Dieticians' intentions to recommend functional foods: the mediating role of consumption frequency of functional foods. *Nutrition Research and Practice*, 75-81.
- Dominguez A.L., Rodrigues L.R., Lima N.M., Teixeira J.A. (2014). An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 324-337.
- El Sohaimy S.A. (2012). Functional foods and nutraceuticals- modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal*, 20, 691-708.
- Ezzati M., Van der Hoorn S., Lawes C.M.M., Leach R., James W.P.T., Lopez A.D., Rodgers A., Murray C.J.L. (2005). Rethinking the "diseases of affluence" paradigm: global patterns of nutritional risks in relation to economic development. *PLoS Medicine*, 2, 404-412.
- Gupta C., Prakash D., Gupta S. (2014). Genetically engineered probiotics. *African Journal of Basic and Applied Sciences*, 6, 57-64.
- Karimi R., Azizib M.H., Ghasemlouc M., Vaziri M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: a review. *Carbohydrate Polymers*, 119: 85-100.
- Kellow N.J., Coughlan M.T., Reid, C.M. (2014). Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 111, 1147-1161.
- Macfarlane G.T., Steed H., Macfarlane S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 305-344.
- Rastall R.A., Gibson G.R. (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 42-46.
- Roberfroid M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830S-837S.
- Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M.J., Léotoing L., Wittrant Y., Delzenne N.M., Cani P.D., Neyrinck A.M., Meheust A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104, S1-S63.
- Siró I., Kápolna E., Kápolna B., Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. *Appetite*, 51, 456-467.
- Vasiljevic T, Shah N.P. (2008). Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714-728.
- Vera C., Guerrero C., Conejeros R., Illanes A. (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 188-194.

# Identificación, establecimiento *in vitro* y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame (*Dioscorea spp.*) empleadas con fines medicinales

## Identification, *in vitro* establishment and preliminary phytochemical analysis of wild yam (*Dioscorea spp.*) used for medicinal purposes

Ramos D. Víctor Andrés\*, Bustamante, R. Silvia Lizette\*, Rincón Velandia, Javier\*\*, Rojas Cardozo, Maritza Adelina\*\*, Raz, Lauren\*\*\*, Buitrago Hurtado, Gustavo\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50711

### Resumen

Tubérculos del género *Dioscorea* comercializados con fines medicinales, fueron recolectados con el propósito de lograr su establecimiento a condiciones *in vitro*. Previamente se lograron identificar taxonómicamente las especies y por medio de análisis fitoquímicos demostrar su potencial farmacéutico. El material recolectado fue identificado como *Dioscorea coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis*, *D. polygonoides* y una especie comestible *D. trifida*. Tubérculos recolectados de centros de acopio y traídos de campo fueron lavados, desinfectados, asperjados con Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>) y sembrados en sustrato BM-2®, en invernadero a 18°C día y 10°C noche. Los tubérculos completos o por secciones fueron almacenados en bolsas herméticas a temperatura ambiente. Posteriormente se desinfectó material vegetal de las especies *D. coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis* y *D. polygonoides*, seleccionando explantes de brotes sanos (*D. coriacea* / laboratorio) para su establecimiento. Se evaluaron tres medios de cultivo para establecimiento, el que presentó los mejores resultados fue Medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con BAP 1 mL/L, AG<sub>3</sub> 1 mL/L y Putrescina 2 mL/L. Para la extracción y análisis de metabolitos secundarios se utilizaron tubérculos de *D. coriacea*, *D. lehmannii* y *D. polygonoides*, empleando como solvente de extracción metanol. Se encontró mayor concentración de extracto vegetal en *D. coriacea* (54%), y mediante cromatografía en capa delgada (CCD), se confirmó la presencia de saponinas, que resultó mayor en comparación con *D. polygonoides* especie reconocida por su alto contenido de saponinas. Estos resultados permitirán realizar análisis más avanzados de los compuestos presentes y plantear su propagación masiva en condiciones *in vitro*.

**Palabras clave:** diosgenina, micropropagación, ñame silvestre, cultivo de tejidos vegetales, saponinas, fitoquímica.

### Abstract

Wild tubers of the genus *Dioscorea* sold for medicinal use were collected for the purpose of achieving its establishment under *in vitro* conditions. First we taxonomically identified the species and through phytochemical analysis demonstrated pharmaceutical potential. The material collected was identified as *Dioscorea coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis*, *D. polygonoides* and the edible species *D. trifida*. Tubers collected from wholesale distributors and from the field were washed, disinfected, sprayed with Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) and planted in substrate BM-2®, in a greenhouse at 18 ° C during the day and 10 ° C overnight. Whole tubers or sections thereof were stored in sealed bags at room temperature. Subsequently plant material of the species *D. coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis* and *D. polygonoides* was disinfected and healthy buds (*D. coriacea* / laboratory) were selected for *in vitro* establishment. Three different culture media were evaluated for establishment; that which presented the best results was the Murashige & Skoog (1962) medium, supplemented with BAP 1 mL / L, GA<sub>3</sub> 1 mL / L and Putrescin 2 mL / L. For the collection and analysis of secondary metabolites, tubers of *D. coriacea*, *D. lehmannii* and *D. polygonoides* were used, using methanol as the extraction solvent. The highest concentration of plant ex-

\* Grupo de Investigación sobre el Cultivo de Ñame. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. varamosd@unal.edu.co, slbustamanter@unal.edu.co, gbuitragoh@unal.edu.co

\*\* Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. jrinconv@unal.edu.co, marojasc@unal.edu.c

\*\*\* Instituto de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Iraz@unal.edu.co

tract, 54%, was found in *D. coriacea*, a higher value than that of *D. polygonoides*, which had been reported previously; the presence of saponins was confirmed by thin layer chromatography (TLC). These results will enable more advanced analysis of the present compounds and enhance their mass propagation under *in vitro* conditions.

**Key words:** diosgenin, micropropagation, wild yam, tissue culture, saponins, phytochemistry.

**Recibido:** agosto 20 de 2014

**Aprobado:** abril 20 de 2015

## Introducción

El género *Dioscorea* agrupa a 600 especies de plantas herbáceas trepadoras, lianas o bejucos, distribuidas mayormente alrededor de los trópicos. Numerosas especies silvestres sirven de alimento en diferentes países en África, Asia, Latinoamérica y Australia, sobre todo en tiempos de carestía o pobreza. Otras son usadas en Asia, Europa, Norte y Centroamérica con fines medicinales, para tratar el reumatismo, cólicos y espasmos intestinales, dolores o como abortivas. Algunas se emplean en fitoterapia y en homeopatía, y popularmente como piscicidas, pediculicidas, insecticidas, para elaborar champús, jabones, o para envenenar flechas para la cacería (Waizel, 2009).

Los ñames en los Estados Unidos son en realidad batatas, por esta razón, el Departamento de Agricultura de los EEUU requiere que la etiqueta “yam” siempre sea acompañada por la de “sweet potato”, los ñames verdaderos sí son especies de *Dioscorea* (USDA, 2012). Los ñames verdaderos han sido comúnmente usados en la industria farmacéutica, para tratar condiciones tan diversas como la inflamación, dolor en articulaciones, diabetes, infecciones y la dismenorrea. Los componentes farmacológicamente activos de las especies de *Dioscorea* incluyen diosgenina, que es una saponina esterooidal, y dioscina, una forma de diosgenina con azúcares.

Entre las diversas metodologías utilizadas para micropropagación de ñame se encuentra el cultivo de meristemas, efectivo para la eliminación de infecciones virales y la conservación del germoplasma. Otro de los mecanismos utilizados para la propagación es la microtuberización, que permite la conservación de material genético básico de clones madres libres de enfermedades en un espacio reducido sin la necesidad de hacer operaciones costosas para recolectar ñame en el campo. (Perea & Buitrago, 2000)

El Grupo de Investigación sobre el cultivo de ñame del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional de Colombia, enfoca sus investigaciones tanto a ñames silvestres como a especies y variedades cultivadas, trabajos que han desarrollado metodologías de cultivo en condiciones *in vitro*, generando conocimiento sobre un cultivo considerados huérfano (FAO 2006), a nivel nacional e internacional, bajo un enfoque claro de incidir favorablemente en la calidad de vida de los productores de ñame de Colombia.

Este trabajo buscó establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de especies de ñame, silvestres y comercializadas en plazas de mercado de Bogotá, contribuyendo de esta manera a futuros trabajos con estas especies al garantizar material vegetal disponible. Como complemento, se propuso identificarlas taxonómicamente y realizar un primer análisis fitoquímico para identificar su potencial fitoterapéutico.

## Materiales y métodos

### Selección del material

Tubérculos conocidos como zarzaparrilla fueron adquiridos en centros de acopio de la ciudad de Bogotá, por secciones y completos, adicionalmente, se contó con material donado (tubérculos con tallos, hojas y raíces) por el Instituto de Ciencias Naturales y el Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia de la Universidad Nacional, y material colectado en diferentes municipios del departamento de Cundinamarca.

### Estudio y determinación de la especie

Para la determinación de la especie de los tubérculos recolectados en su hábitat natural provenientes de campo, se tuvo en cuenta caracteres morfológicos que definen las características del género y la especie, tomando como referencia las colecciones en el Herbario Nacional Colombiano (COL) y la literatura botánica (Knuth, 1924). Se registró altitud, localidad, descripción de la planta, y especie. Para los demás tubérculos, se reportaron los caracteres morfológicos que definen las características de las especies del género *Dioscorea* spp., color y diámetro del tallo tanto joven como maduro, presencia o no de espinas en la base o en todo el tallo, presencia o ausencia de tubérculos aéreos, forma del tubérculo subterráneo así como su anchura, color de la epidermis, color de la parénquima, presencia o ausencia de grietas en su superficie y propiedades organolépticas del tubérculo (IPGR/IITA, 1997).

### Adaptación de ñame silvestre en invernadero

Los tubérculos adquiridos en centros de acopio fueron previamente lavados con detergente y agua y sembrados en macetas, previamente se les aplicó Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>) por aspersión para romper la dormancia. Tubérculos donados en secciones que se encontraban en bolsas herméticas con desarrollo de brotes,

fueron lavados y desinfectados para establecimiento. Tubérculos provenientes de campo fueron lavados y almacenados en bolsas herméticas durante 1 mes para romper dormancia y se sembraron en invernadero.

Tubérculos lavados con abundante agua y jabón, fueron sembrados en macetas con BM2® (mezcla para germinar) y arena 2:1, llevados a invernadero, riego cada dos días, 20°C día, 10°C noche, revisión diaria de los tubérculos sembrados y semanal de brotes y raíces, registrados a los 8, 15, 30 y 60 días. A los 30 días se dispusieron a temperatura a la ambiente (aproximadamente 18°C día y 10°C noche).

### **Introducción del material vegetal a condiciones in vitro**

Esquejes nodales fueron cortados de un tamaño de 2 cm cada uno y lavados con abundante agua y extrán, sumergidos en solución de Tween 20, 8 mL / 100 mL de agua destilada estéril, Isodine® al 3,5 % por 30 minutos, cuyo ingrediente activo es yodo polividona, hipoclorito de sodio 2,5 % por 15', enjuague 3 veces con agua destilada estéril entre cada paso por 5'.

### **Establecimiento in vitro de explantes**

Se emplearon segmentos uninodales desprovistos de hojas con una longitud de 15 mm, procedentes de tallos de las plantas donantes, los explantes fueron sembrados individualmente en 20 mL de medio/frasco, se utilizaron 12 frascos/tratamiento, se evaluó contaminación a los 3, 5, 8 y 15 días de sembrados. Los medios empleados fueron los siguientes:

- i. Medio M&S (1962), Tiamina 3 mL/L, BAP 2 mL/L, carbón activado 3 mL/L, Sacarosa 30 g/L, Agar 5 g/L.
- ii. Medio M&S (1962), Vitaminas Morel 2 mL/L, Ácido Fólico 1 mL/L, L-Asparagina 4 mL/L, Cisteína 10 mg/L, Sacarosa 30 g/L, Agar 5 g/L.
- iii. Medio M&S (1962), Tiamina 3 mL/L, BAP 1 mL/L, AG<sub>3</sub> 1 mL/L, Putrescina 2 mL/L, Sacarosa 30 g/L, Agar 5 g/L.

### **Extracción y análisis de metabolitos secundarios**

Tubérculos recolectados fueron lavados, cortados y secados en estufa con circulación forzada de aire durante 48 h. Posteriormente fueron molidos en un molino de martillos y se realizó la extracción con metanol, por percolación exhaustiva. El solvente fue retirado del extracto empleando rotavaporador rotatorio acoplado a una bomba de vacío a 38 °C. Una vez obtenido el extracto seco, se procedió a la caracterización de cada uno de los extractos por la técnica de Cromatografía en capa delgada (CCD), sobre sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, empleando las siguientes fases móviles:

- i. Metanol: Cloroformo: Ácido Acético. 6:6:1,
- ii. Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido glacial acético: Agua. 100:11:11:27,
- iii. Cloroformo: Acetato de etilo 4:1,
- iv. Metanol: Cloroformo: Ácido Acético 7:3:1,
- v. Acetato de etilo: Metanol: Ácido fórmico: Ácido glacial acético 100: 27: 11:11,
- vi. Metanol: Cloroformo 9:1.

Las placas se revelaron con los reactivos de Godín (Vainillina en etanol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol) y anisaldehído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabla 1.** Especies silvestres utilizadas para extracción (Diferentes colectas).

| Muestras | Tubérculo seleccionado         |
|----------|--------------------------------|
| M1       | <i>Dioscorea lehmannii I</i>   |
| M2       | <i>Dioscorea lehmannii II</i>  |
| M3       | <i>Dioscorea lehmannii III</i> |
| M4       | <i>Dioscorea coriacea I</i>    |
| M5       | <i>Dioscorea coriacea II</i>   |
| M6       | <i>Dioscorea polygonoides</i>  |

### **Análisis estadístico**

Para determinar el medio con mejores resultados y verificar diferencias significativas, se realizó un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , mediante el programa Statistix de Windows®.

### **Resultados y discusión**

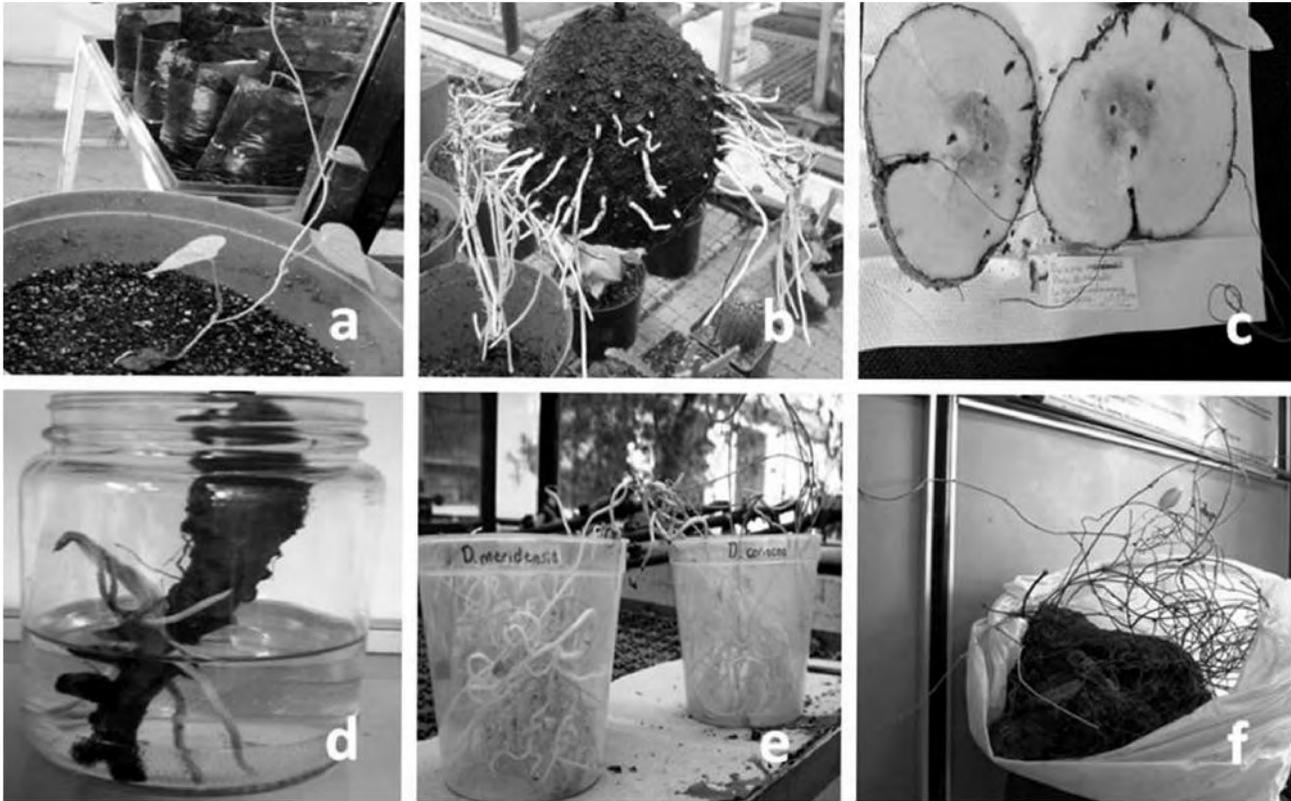
#### **Selección del material**

El material recolectado en plazas de mercado fue identificado taxonómicamente como *D. lehmannii*, tubérculos donados en secciones, fueron identificados como *D. coriacea* y *D. meridensis*. Tubérculos recolectados provenientes de campo fueron identificados como *D. coriacea*, *D. polygonoides* y *D. lehmannii*. Tubérculos de *D. trifida* provenían de la región de Chocó, de una plaza de mercado en Quibdó. Tubérculos de *D. polygonoides* solo fueron usados para obtención de un extracto de referencia. El material de *D. coriacea* correspondió al tubérculo donado por laboratorio del Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia de la Universidad Nacional. Los tubérculos de *Dioscorea spp.* fueron adquiridos en plazas de mercado, se les atribuye que previenen y alivian dolencias relacionadas con el sistema sanguíneo, purificador o reconstituyente, sin embargo, tubérculos de diferentes especies son ofertados bajo el mismo nombre de zarzaparrilla, lo cual genera incertidumbre sobre el efecto

fitoterapéutico atribuido. La figura 1 y la tabla 2 presentan el material recolectado.

Pinzón (2011), registró 72 puestos de plantas medicinales en 26 puntos comerciales distribuidos en 12 de

las 20 localidades de Bogotá D.C. plazas primarias, secundarias y puestos individuales, siendo *D. coriacea* y *D. meridensis* (62 - 60%), las especies con mayor oferta en Bogotá. *D. lehmannii* también fue adquirida en varios puntos de venta de la ciudad.



**Figura 1.** Tubérculos de *Dioscorea* recolectados. **a.** *D. lehmannii* en salida de campo, **b.** *D. lehmannii* en plaza de mercado cortado punta de base, **c.** *D. coriacea* cortados en secciones almacenados en bolsas herméticas, **d.** *D. trifida* **e.** *D. coriacea* y *D. meridensis* donados por laboratorio en secciones, **f.** *D. coriacea* donado por laboratorio.

**Tabla 2.** Tubérculos seleccionados.

| Tub. | Especie              | Procedencia y                        |
|------|----------------------|--------------------------------------|
| T1   | <i>D. lehmannii</i>  | Salida de campo. Tubérculo completo, |
| T2   | <i>D. lehmannii</i>  | Plaza de Mercado. Corte de base      |
| T3   | <i>D. lehmannii</i>  | Plaza de mercado. Tubérculo completo |
| T4   | <i>D. trifida</i>    | ICN. Tubérculo completo              |
| T5   | <i>D. coriacea</i>   | ICN. Cortados en secciones           |
| T6   | <i>D. meridensis</i> | ICN. Cortados en secciones           |
| T7   | <i>D. coriacea</i>   | GIFFUN. Tallos y hojas               |

Al colocar los tubérculos en bolsas plásticas se generaron abundantes brotes, siendo la especie *D. coriacea* (figura 1f), la que mayor número de brotes desarrolló. Similares resultados reportaron Hata y colaboradores (2003) quienes reportaron dormancia en el período comprendido entre la cosecha del tubérculo y el almacenamiento en bolsas herméticas del material en tubérculos de *D. rotundata*, material del que se obtuvo mayor contenido de sapogeninas y presencia de diosgeninas, infiriendo que el fenómeno de dormancia tiene relación con un aumento en el contenido de algunas sapogeninas, posiblemente porque al consumirse almidón del tubérculo para la formación de tallos, la proporción de sapogeninas aumenta, con respecto a la cantidad de material seco.

Los tubérculos colocados previamente en bolsas herméticas presentaron brotes nodales (T1, T5, T6, T7),

como era de esperarse los tubérculos sembrados en BM2® y asperjados con AG<sub>3</sub> produjeron abundantes raíces (T2, T3, T4), debido a la acción que cumplen las giberelinas en la activación del metabolismo, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva para generar la elongación del embrión o en este caso la formación de raíces. Tubérculos de la especie *D. lehmannii* y *D. trifida* (T2,T3,T4), que solamente produjeron raíces y no brotes, no fueron utilizados dentro de los ensayos debido a que el material, los diseños de desinfección y establecimiento eran para yemas nodales.

La acción del AG<sub>3</sub> no es tóxica para humanos ni animales y es de fácil manejo. Las técnicas pueden variar de inmersión del tubérculo o aspersión, esto depende de la variedad y del estado de reposo en que se encuentran los tubérculos, causando en muchas variedades la brotación cuando el período de reposo casi ha finalizado. Para inmersión, Marca (1997) sugiere que los tubérculos recién cosechados sean lavados y desinfectados, se deben secar al aire y luego sumergir en una solución de AG<sub>3</sub> (5 ppm) por 10 minutos. Después del tratamiento los tubérculos deben secarse y colocarse en una cámara o ambiente caliente entre 18 y 25°C para inducir la brotación. Luego de 15 días el brotamiento es abundante.

### Estudio y determinación de la especie

Especies identificadas provenientes de campo fueron registradas de acuerdo a sus características (ver materiales y métodos), y comparadas con ejemplares del género *Dioscorea* en el Herbario Nacional Colombiano (ver tabla 3). Información sobre la distribución de las especies fue consultada en la base de datos del Herbario ([www.biovirtual.unal.edu.co](http://www.biovirtual.unal.edu.co)). La mayoría de las especies de *Dioscorea* son de latitudes tropicales, con pocas excepciones en Norteamérica, Europa y el oriente de Asia. Wilson (1977) incluye a las especies asiáticas *D. japonica* y *D. opposita*, como tolerantes a heladas, sin embargo para *D. alata* y especies tropica-

les comestibles, temperaturas inferiores a los 20 °C restringen el crecimiento y se favorece con temperaturas entre 25 y 30 °C, limitados por el rango de latitudes comprendido entre 20° N y 20° S y altitudes máximas de 1000 msnm.

Se puede inferir que las especies silvestres de *Dioscorea* poseen diferencias significativas en sus condiciones de adaptación frente a las especies comestibles, siendo un factor importante el contenido de diosgenina o de saponinas derivadas de ésta, el cual es proporcional al consumo de almidón por parte del tubérculo, que es mayor en las condiciones agroecológicas de bosques, subpáramos y páramos, donde se encuentran las especies silvestres que generalmente crecen sin mayor atención por parte del agricultor.

### Adaptación de ñame silvestre

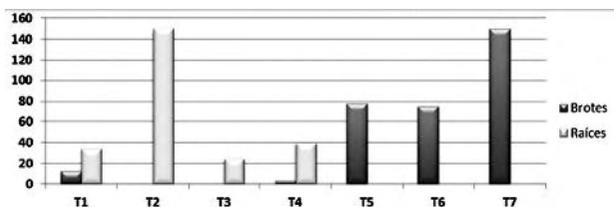
Todos los tubérculos de *D. lehmannii* (T2, T3), especies silvestres de *Dioscorea* traídas de campo (T1) y de *D. trifida* (T4), se sembraron a las mismas condiciones, presentando brotación de raíces más lenta. En las condiciones de siembra los tubérculos presentaron brotes y raíces simultáneamente. El material donado de laboratorio, se sembró en invernadero, al igual que las secciones de diferentes especies donadas por el Instituto de Ciencias Naturales (T5, T6).

La figura 2, permite determinar que solo los tubérculos colocados previamente en bolsas herméticas produjeron brotes, y que los asperjados con AG<sub>3</sub> produjeron raíces, lo cual no era favorable para el establecimiento. Es posible, que la humedad generada en las bolsas favorezcan el crecimiento del follaje por las altas tasas respiratorias, y la ausencia de esta fase de humedad con adición de AG<sub>3</sub> genere raíces y no brotes, debido a las tres fases del ñame designadas como reposo, crecimiento vegetativo y crecimiento reproductivo. La brotación de los tubérculos señala la finalización del período de reposo y el inicio de la fase vegetativa, ca-

**Tabla 3.** Altitudes registradas para las especies silvestres recolectadas (ICN).

| Especies                 | Colecciones en COL | Alt. Mín. | Alt. Máx. | Alt. Max. prom | Alt. Min. prom |
|--------------------------|--------------------|-----------|-----------|----------------|----------------|
| <i>D. coriacea</i>       | 66                 | 400       | 3700      | 2212,5         | 2317,6         |
| <i>D. lehmannii</i>      | 16                 | 1650      | 3600      | 2521,4         | 2621,4         |
| <i>D. meridensis</i> *   | 17                 | 500       | 2500      | 1708,8         | 1738,8         |
| <i>D. polygonoides</i> * | 53                 | 10        | 2000      | 1283,8         | 1328,9         |
| <i>D. trifida</i>        | 23                 | 5         | 1120      | 244,6          | 255,4          |

\* Datos actualizados en Raz (2015)



**Figura 2.** Crecimiento de Brotos y Raíces de Dioscorea T1-T4 Invernadero, T5-T7 Donados.

racterizada por un rápido crecimiento de los tallos y las hojas.

Haynes *et al.*, (1967) indicó para *D. alata* que la fase reproductiva inicia cuando la tuberización alcanza una tasa de crecimiento exponencial, la cual coincide con una reducción del crecimiento de los tallos y las hojas, la fase reproductiva del ñame coincidiría con la floración seguida por la maduración de los tubérculos.

Los tubérculos tratados con AG<sub>3</sub>, presentaron raíces, teniendo en cuenta que el tipo de explante requerido eran brotes o yemas, no fueron empleados para la fase de establecimiento. Así mismo tubérculos cortados en secciones y almacenados en bolsas presentaron mejores resultados, reflejados en mayores brotes, lo cual concuerda con Fergusson (1977), que uso secciones de tubérculos de *D. alata*, siendo menor el tiempo necesario para iniciar el crecimiento de los tubérculos. Estos resultados permiten interpretar que esta fase está caracterizada por una acelerada división celular y expansión de células que posteriormente estarán involucradas en la microtuberización.

### Desinfección del material vegetal

El material utilizado provenía de condiciones donde la presencia de microorganismos o agentes contaminantes es elevada. Solamente el protocolo que incluyó Isodine® (Yodo PVP), como desinfectante, tuvo resultados favorables, la calidad del explante (invernadero, campo o laboratorio), así como también el tipo de explante (raíz o tallo) también fueron factores importantes en el establecimiento. Bonafont (2011), indica para el Isodine®, que la solución en sí no es activa, pero libera el yodo lentamente, que es el que posee la actividad bactericida, penetrando a través de la pared celular y combinándose con diferentes sustratos orgánicos, mediante reacciones de oxidoreducción.

Los mejores resultados se obtuvieron de yemas jóvenes provenientes de las puntas de los tallos, donde posibles contaminantes endógenos no habían invadido los haces vasculares de la planta.

### Establecimiento de explantes

Explantes nodales del medio iii reportaron brotes 30 días después de sembrados (0.2 – 0.5 cm), a los 60

días aún no estaban listos para multiplicación (1 – 1.5 cm), en el medio i el crecimiento se reportó a los 45 días de sembrados debido a la ausencia de reguladores y el medio ii tampoco presentó mayor desarrollo de brotes (0.8 – 1 cm).

Segmentos nodales de *D. coriacea* donados por laboratorio, presentaron mejores resultados en el medio iii (1 – 1.5 cm), que contenía BAP y AG<sub>3</sub> como reguladores de crecimiento, los resultados fueron favorables en el medio que se adicionó AG<sub>3</sub>, el cual es empleado para el crecimiento de los tallos y fundamentalmente para el rompimiento en la dormancia de algunas especies. (Ver figura 3)

La poliamina Putrescina es considerada un regulador de crecimiento y desarrollo de plantas por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular en bajas concentraciones. En el diseño del medio se incluyó la putrescina por su capacidad antioxidante y estabilizadora de las membranas (Perea, 2010).

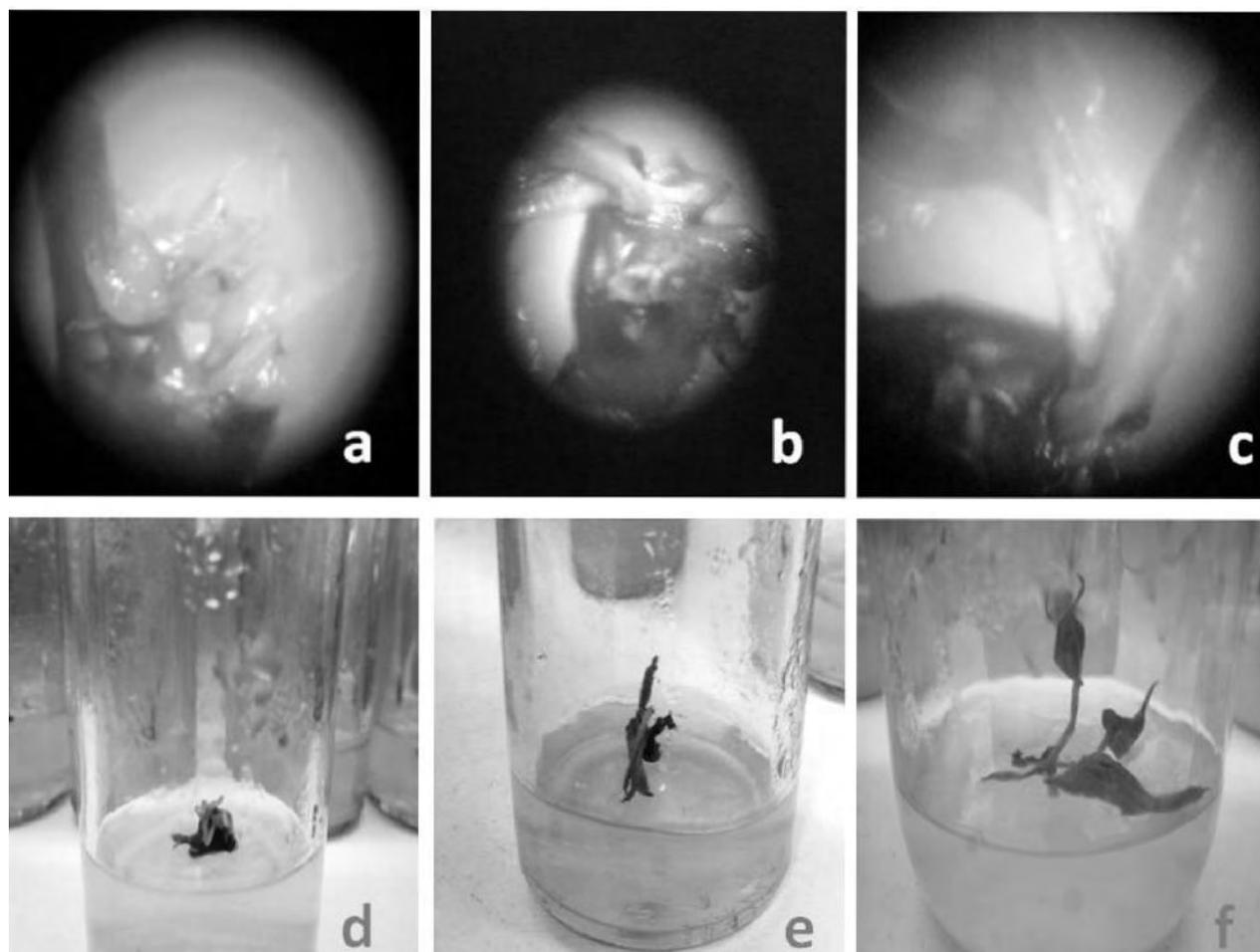
Los análisis estadísticos permitieron determinar que el mejor tratamiento fue T3 (iii), encontrando una diferencia significativa a los 30 y 60 días de 0,0578. No se encontraron diferencias significativas en T1 y T2.

### Extracción y análisis de metabolitos secundarios

Las placas revelaron que todas las muestras contienen sapogeninas, el color y la formación de espuma, fue un indicador cualitativo, las bandas revelaron mayor concentración en las muestras que presentaban un color rojo más fuerte.

El solvente de extracción fue el metanol que presentó mayor proporción de sustancias polares. La fase móvil que permitió obtener un mejor perfil de los extractos está constituida por una mezcla de Acetato de etilo: Metanol: Ácido fórmico: Ácido glacial acético 100: 27: 11:11, una fase móvil frecuentemente empleada para la detección de flavonoides. (Ver figura 4)

Las diferentes placas cromatográficas permitieron determinar que hay un grupo de compuestos orgánicos de alta polaridad presentes en los extractos de *D. coriacea*, *D. lehmannii* y *D. meridensis*, y permitieron corroborar que en todas las especies evaluadas hay presencia de sapogeninas, debido a la formación de espuma como indicador cualitativo. La cromatografía en capa delgada mostró compuestos tipo sapogeninas más polares que las presentes en *D. polygonoides*, lo que permite inferir un alto grado de glicosilación. Como ya habían observado Hata y colaboradores (2003), al analizar los metabolitos presentes en *D. rotundata*; la concentración de sapogeninas obtenidas para cada muestra están relacionadas con el número de sapogeninas detectadas, concluyendo que existe una correlación entre ambos resultados, es decir que *D. rotundata* presentó un mayor número de sapogeninas y una mayor concentración de estos compuestos.



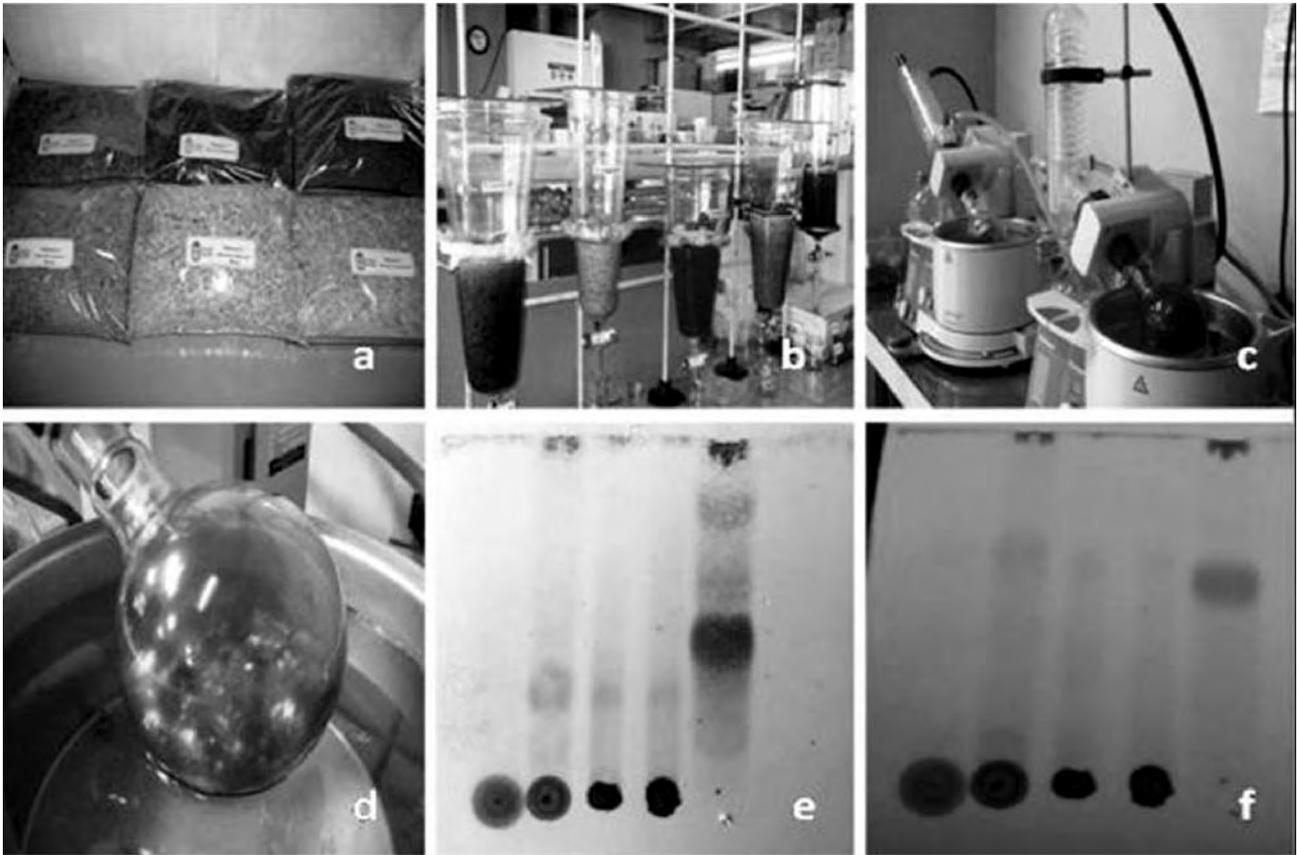
**Figura 3.** Establecimiento explantes de *D. coriácea*. **a, b.** Brotes observados en estereoscopio después de 30 días, **c.** Brotes después de 60 días, **d.** Yemas nodales 30 días, **e.** Yemas nodales 60 días **f.** Yemas nodales 90 días después de establecidas.

Los resultados de la extracción (tabla 4) mostraron que el mayor rendimiento se obtuvo con *D. coriácea*, con un rendimiento de 54 y 21% para cada muestra procesada, seguida por *D. polygonoides* y *D. lehmannii*. Las placas revelaron sustancias polares (figura 4e y 4f), sin embargo en las diferentes especies se detectan grupos de metabolitos diferentes a saponinas que re-

velaron de color amarillo con el reactivo de Godin. Estos resultados conllevan a proponer análisis por CLAE (cromatografía líquida de alta eficiencia), o aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios para determinar su naturaleza química. Al variar de especie se detectan grupos de metabolitos diferentes, no solo saponinas, y otros metabolitos que presentan

**Tabla 4.** Pesos obtenidos en las muestras y rendimiento de saponinas.

| Muestra           | Material seco (g) | Extracto seco (g) | Rendimiento (%) |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| M1 (DI I + DI II) | 413,68            | 72,48             | 17              |
| M2 (DI III)       | 487,3             | 24,101            | 5               |
| M3 (Dc I)         | 567,9             | 120,98            | 21              |
| M4 (Dc II)        | 616,5             | 330,46            | 54              |
| M5 (Dp)           | 265               | 49,66             | 18              |



**Figura 4.** Extracción de metabolitos secundarios. **a.** Tubérculos de ñame molidos y empaçados, **b.** Montaje en percoladores, **c,** **d.** Extracción de solvente metanólico en rotavaporador **e.** Revelado de la placa con reactivo de Godin **f.** Revelado de las bandas con ultravioleta.

color amarillo y que también se convierten en objeto de estudio por medio de análisis más detallados como HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia), o aislamiento de los metabolitos para identificación por análisis de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo, entre otros.

En estudios realizados por Flores (2010), registrado por Reina (2012), en el documento de Trabajo sobre Economía Regional del Ñame, evaluaron el contenido de saponinas en ocho especies incluida *D. polygonoides*, existentes en la región Caribe con el fin de determinar su potencial uso con fines medicinales y farmacéuticos. Las especies analizadas fueron *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. dodecaneura*, *D. esculenta*, *D. polygonoides*, *D. rotundata* y *D. trifida*. Los resultados mostraron que la especie *D. polygonoides* es la de mayor presencia de saponinas.

Igualmente Hata y colaboradores (2003) encontraron saponinas en *D. alata* y *D. rotundata*, estos resultados se basaron en la hidrólisis de las saponinas para obtener las saponinas libres, el estudio presentó una forma práctica para detectar saponinas por cromatografía en capa delgada de tipo diosgenina/yamogenina

y tigogenina/neotigogenina en la mayoría de las accesiones, empleando *D. polygonoides* como referencia al considerar que esta especie ha sido ampliamente estudiada y se conoce la polaridad y estructura de las saponinas y terpenos.

La especie *D. coriacea* presentó un extracto del 54% en base seca, por lo que constituye una especie con aparente alto potencial de contenido de saponinas, si tenemos presente el valor fitoterapéutico que se le reconoce en su uso tradicional y popular en el tratamiento de diferentes condiciones de salud como la hipercolesterolemia y la diabetes, se amplía su potencial. Como ya mencionaban Hata y colaboradores (2003), “un mejoramiento de estas especies puede convertirlas en especies promisorias para la obtención de saponinas esteroidales”.

### Conclusiones

Las mejores condiciones para la formación de brotes se lograron colocando el material por aproximadamente 30 días en condiciones de temperatura de 18°C día y 10°C noche.

Los medios de cultivo con una dosis de 1 mL/L de AG<sub>3</sub>, resultaron los más apropiados en la formación de brotes en *D. coriacea*, bajo las condiciones de experimentación. Medios de cultivo que contenían solamente BAP indujeron la formación de callos, igualmente la poliamina Putrescina resultó efectiva como antioxidante.

Las especies silvestres de *Dioscorea* que fueron recolectadas, presentaron alto contenido de saponinas, indicadores cualitativos como la actividad tensoactiva revelada por la formación de espuma, y la presencia de las bandas por CCD que manifiestan como positivas estos metabolitos.

Como resultado de este trabajo, se propone un procedimiento para establecer a condiciones *in vitro* la especie *D. coriacea*, la cual podrá ser implementada a otras especies e igualmente permitirá el diseño de medios de cultivo para las etapas de multiplicación, enraizamiento y microtuberización.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia y a los apoyos científicos otorgados por la Doctora Margarita Perea Dallos y el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma / Bayamo - Cuba, especialmente al Doctor Misterbino Borges.

### Referencias bibliográficas

Bonafont, X. (2012). Antisepsia y desinfección en el hospital. Recuperado: 20 de noviembre de 2012 en <http://www.combino-pharm.es/wp-content/uploads/2014/07/MONO-GRAFIA-ANTISEPTICOS.pdf>. 13 - 14.

Fergusson, T. U. (1977). Tuber development in yams; physiological and agronomic implications. In Third Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. Proceedings. Ibadán, Nigeria. *International Institute of Tropical Agriculture*. 72 - 77.

Flores, G. (2010). Evaluación del contenido de saponinas en ocho especies de ñame (*Dioscorea spp.*), y actividad antioxidante de los extractos clorofórmicos. XXIX Congreso Latinoamericano de química.

Food Agricultural Organization (2012). Iniciativa mundial de fitomejoramiento. *The way forward to strengthen national plant breeding and biotechnology capacity*. Recuperado: febrero 4 de 2012 en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0606sp1.htm> en.

Hata, Y., Reguero, M. T., de García, L. A., Buitrago, G., & Álvarez, A. (2003). Evaluación del contenido de saponinas en variedades nativas de ñame (*Dioscorea spp.*) provenientes de la co-

lección de la Universidad de Córdoba. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéutica*, 32(2), 149-57.

Haynes, P. H., Spence, J. A., & Walter, C. J. (1967, April). The use of physiological studies in the agronomy of root crops. In 1st. *International Symposium Society for Tropical Root Crops* (Vol. 3, pp. 1-15).

International Plant Genetic Resources Institute - International Institute of Tropical Agriculture (1997). *Descriptores para el ñame (Dioscorea spp.)*. Recuperado de [http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Descriptores\\_para\\_el\\_%C3%B1ame\\_\\_Dioscorea\\_spp.\\_\\_481.pdf](http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Descriptores_para_el_%C3%B1ame__Dioscorea_spp.__481.pdf)

Knuth, R. (1924). *Dioscoreaceae* En A. Engler (editor) *Das Pflanzenreich* Vol. IV.43. 387 pp. Engelmann, Leipzig.

Marca, J. (1997). Métodos para acelerar el brotamiento de los tubérculos - semillas, Producción de tubérculos, manual de capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP).

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Perea, M., & Buitrago, G. (2000). Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. Ñame: producción de semillas por biotecnología. Ed.: M Guzmán y G Buitrago. Universidad Nacional de Colombia. Editorial Unibiblos. Bogotá, DC, 17-19.

Perea, M. (2010). Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*, Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, sede Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 21 - 27, 34.

Pinzón, A. (2011). *Uso Medicinal tradicional de Dioscorea (Dioscoreaceae) en Bogotá D.C., Colombia* Contribución que hace parte del proyecto "Sistemática y etnobotánica del género *Dioscorea* en Colombia". Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Raz, L. (2015) *Dioscoreaceae* en Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado de: <http://catalogoplantascolumbia.unal.edu.co>

Reina, A. (2012). Documentos de Trabajo sobre Economía Regional. *El cultivo del ñame en el Caribe Colombiano*. Banco de la República, Centro de Estudios Económicos Regionales. Cartagena, Colombia.

Statistix, 8. (2003). *Statistix 8: Analytical Software User's Manual*. Tallahassee, Florida, U.S.A.

United States Department of Agriculture. (2012). National Agricultural Library. Recuperado: 03 de febrero de 2012 en <http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=default&l=115&w=33776&n=1&s=5&t=2>

Waizel, J. B. (2009). El uso tradicional de las especies del género *Dioscorea*. Departamento de Investigación. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. *Revista de Fitoterapia*, 9 (1) 53-67.

Wilson, L. A. (1977). Root Crops. In: Alvin, P. T.; Kozłowski, T. T. Eds. *Ecophysiology of tropical Crops* - New York, Academic Press. 187 - 236.

# Efecto de la carga orgánica de la gallinaza de jaula en el potencial de biometanización

## Effect of chicken manure organic load on biomethane potential

Marin-Batista Jose\*, Castro Liliana\*\*, Escalante Humberto\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.39971

### Resumen

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la carga orgánica expresada en función de la relación inóculo/sustrato (RIS) sobre el potencial de biometanización de la gallinaza de jaula usando como inóculo lodo estiércol bovino. Se llevaron a cabo ensayos de biodegradación anaerobia a temperatura mesofílica de 39 °C. Para cada una de las cargas orgánicas evaluadas (16.6, 11.0, 8.3, 6.6 y 5.5 g SV/L) se cuantificaron las variables: ácidos grasos volátiles totales, alcalinidad, concentración amonio y volumen acumulado de metano. El mayor potencial de biometanización (0.58 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg SV) se alcanzó cuando la biodegradación anaerobia se llevó a cabo con una RIS de 1.0. Los resultados obtenidos demuestran que la gallinaza es un sustrato potencial para ser degradado por digestión anaerobia y el rendimiento del proceso es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Este estudio también confirma que la RIS permite diluir la concentración de compuestos inhibitorios como el amonio en el caso de la gallinaza de jaula.

**Palabras clave:** digestión anaerobia, gallinaza de jaula, relación inóculo/sustrato, amonio.

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of inoculum to substrate ratio (ISR) on biomethane potential of chicken manure using cattle slurry as inoculum. Biomethane potential assays were carried out at 39 °C mesophilic temperature. Total fatty acids, total alkalinity, ammonium concentration and accumulative methane volume were measured to evaluate organic load (16.6, 11.0, 8.3, 6.6 y 5.5 g VS/L). The highest biomethane potential (0.58 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg SV) was reached when anaerobic biodegradation was carried out to ISR of 1.0. The results demonstrate that chicken manure is a potential substrate to be degraded by anaerobic digestion and process performance is directly proportional to substrate concentration. This study also confirms that ISR allow dilution of inhibitory components as ammonium by the case of chicken manure.

**Key words:** anaerobic digestion, chicken manure, inoculum substrate ratio, ammonia.

**Recibido:** febrero 10 de 2014

**Aprobado:** abril 9 de 2015

### Introducción

El sector avícola es uno de los sustentos de la economía y alimentación en Colombia. La mayoría de granjas avícolas existentes en el país se encuentran en los departamentos de Cundinamarca (28 %), Santander (24 %) y valle del cauca (13 %) (Escalante *et al.*, 2010). En los diferentes procesos de la actividad avícola se generan residuos como: gallinaza, pollinaza, aves muertas, residuos grasos y cáscaras de huevos. Estos residuos causan problemas de contaminación

ambiental, salud pública y animal (Delgado, 2011). La gallinaza de Jaula (GJ) mezcla de deposiciones sólidas y líquidas de los animales, es el residuo orgánico más representativo que generan las explotaciones avícolas tanto por su volumen como por sus características fisicoquímicas (Rosales *et al.*, 2007). Durante el proceso industrial de cría especializada en aves de corral, se genera una cantidad promedio de GJ de 107.98 toneladas por millar de aves (Escalante, *et al.*, 2010). Mediante procesos biológicos y térmicos, es posible

\* cMSc, Universidad Industrial de Santander, Colombia. jdmbatista05@gmail.com.

\*\* PhD, Profesora Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia licasmol@uis.edu.co.

\*\*\* PhD, Profesor Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia escala@uis.edu.co.

aprovechar los subproductos de los procesos avícolas en la elaboración de nuevos productos como el compost de gallinaza y harina de carne respectivamente (Huang *et al.*, 2011; Rosales *et al.*, 2007). Sin embargo, estas tecnologías no son suficientes para tratar las cantidades generadas por el sector los volúmenes de residuos generados en el sector. La GJ está compuesta principalmente por proteína (20.5 %), celulosa (20 %), hemicelulosa (23.2 %), lignina (1.6 %) y ácidos grasos volátiles (AGV) (0.3 %). Esta elevada concentración de materia orgánica convierten a la GJ en un sustrato atractivo para la digestión anaerobia (DA) (Li *et al.*, 2013). Los sistemas de bioconversión anaerobia son procesos biológicos donde la materia orgánica es reducida hasta metano y dióxido de carbono por la acción de diferentes grupos microbianos que trabajan en sintrofia. Los microorganismos involucrados en la DA corresponden a) Bacterias fermentativas-hidrolíticas b) Bacterias acetogénicas y c) Arqueas metanogénicas. El primer grupo está representado por los géneros *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* los cuales producen enzimas que desdoblan lo polímeros orgánicos hasta monómeros fácil fermentables. Luego las bacterias acidogénicas metabolizan los monómeros para generar acetatos, propionatos y butiratos que son reducidos posteriormente por las bacterias acetogénicas hasta acetato, dióxido de carbono e hidrógeno. Finalmente, las arqueas metanogénicas actúan sobre el acetato e hidrogeno para transformarlo en metano (Gerardi, 2003). Estudios sobre DA a condiciones mesofílicas, han reportado rendimientos en la producción de metano entre 0.29 y 0.50 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg SV, utilizando GJ como sustrato y lodo anaerobio de plantas de tratamiento de aguas residuales como inóculo (Li *et al.*, 2013; Nui *et al.*, 2013).

Un parámetro importante a nivel operacional en DA es la carga orgánica representada mediante la relación Inóculo/sustrato (RIS) (Hashimoto *et al.*, 1989). Se ha demostrado experimentalmente, que la RIS afecta la velocidad de biodegradación del sustrato, por tanto este parámetro permite especificar el potencial de biometanización (PBM) y hacer estudios de DA comparables para cualquier tipo de sustrato (Raposo *et al.*, 2011). Los primeros estudios relacionados con la influencia de carga orgánica sobre PBM en términos de la RIS, se llevaron a cabo en operación discontinua, usando ensilado de maíz como sustrato y lodo estiércol bovino como inóculo en concentraciones volumétricas de 0 (control), 10, 30, 50, 70 y 90 %. Los resultados mostraron que para altas cargas orgánicas (valores de RIS por debajo de 0.25) la velocidad de biodegradación del sustrato fue lenta comparada con la velocidad de biodegradación del sustrato para valores en la RIS cercanos a 2 (Hashimoto *et al.*, 1989). Resultados similares fueron obtenidos por Raposo *et al.*, (2006), para la DA del mismo sustrato usando lodo estiércol bovino como inóculo a RIS entre 1 y 3.

La influencia de la RIS sobre el PBM también ha sido estudiada para los desechos de comida y residuos agroindustriales. Se comprobó que existe una relación lineal decreciente entre los rendimientos de biogás y la RIS (Liu *et al.*, 2009). Neves *et al.*, (2004), afirmó que para la DA de desechos de cocina utilizando lodo granular y lodo suspendido como inóculo, la selección de la RIS llega a ser más determinante que la misma actividad metabólica del inóculo. Por consiguiente, en los estudios de DA se requiere establecer una carga orgánica en función de una RIS, que permita el arranque y estabilización del proceso.

El criterio para establecer un valor de RIS gira en torno a la complejidad de biodegradación del sustrato. En el caso de la GJ, concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) entre 2000 - 4800 mg/L y alcalinidad (AT) entre 4700 - 13600 mg/L permiten un adecuado arranque del proceso anaerobio (Salminen y Rintala, 2002; Callaghana *et al.*, 2002). Sin embargo, la GJ también contiene nitrógeno amoniacal que en concentraciones superiores a 5000 mg/L ejercen un efecto tóxico o inhibitorio sobre la actividad microbiana afectando la estabilidad del proceso (Nue *et al.*, 2013).

Owen *et al.* (1979), establecieron que valores superiores a 1 en la RIS permiten diluir la concentración de compuestos tóxico presentes en el sustrato. Adicionalmente, Chynoweth *et al.* (1993) observaron que para sustratos como la celulosa se requiere una RIS de 2.0 para evitar inhibición por elevada acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV). La acidificación producida por la baja capacidad buffer en la biodegradación anaeróbica de residuos de cocina y la inhibición causada por la liberación ortofosfatos en la DA de algas también fueron controladas al establecer una RIS superior a 1.0 permitiendo operar el proceso en valores de pH dentro del rango adecuado (6.0-8.5) para la DA (Zeng *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la relación inóculo sustrato sobre el potencial de biometanización de la GJ. El desarrollo de este objetivo, permite establecer el efecto que involucra la variabilidad de sustrato en la digestión de residuos con alta concentración de amonio.

## Materiales y métodos

**Sustrato e inóculo.** El sustrato utilizado en la experimentación corresponde a GJ recolectada de una granja avícola localizada en el municipio de Lebrija-Santander, Colombia. La GJ se mantuvo refrigerada a baja temperatura (4 °C) durante la etapa de caracterización y análisis. Se utilizó como inóculo lodo estiércol bovino, procedente de un frigorífico en Santander.

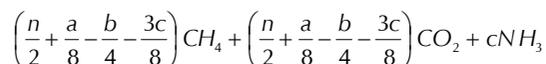
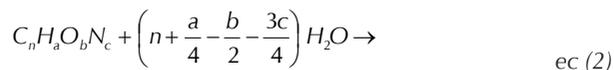
**Diseño experimental.** El potencial de biometanización (PBM) de la GJ fue determinado experimentalmente de acuerdo al protocolo establecido por Angelidaki *et al.*, (2009). Se evaluaron cinco cargas orgánicas 16.6 (RIS

1.0), 11.0 (RIS 1.5), 8.3 (RIS 2.0), 6.6 (RIS 2.5) y 5.5 (RIS 3.0) g SV/L, en biodigestores de 60 ml, con una cantidad fija de inóculo de 0.58 g de SV. Para garantizar condiciones de anaerobiosis en el sistema, los biodigestores fueron purgados con nitrógeno durante 2 min y sellados con tapones de butilo y agrafes de aluminio. Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo por triplicado durante 30 días en condiciones mesofílicas de temperatura (39 °C±2) en una incubadora (BD-53+RS422 WTB BINDER).

**Procedimientos y métodos analíticos.** Los ácidos grasos volátiles (AGV), alcalinidad total (AT), pH, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y volumen de metano acumulado fueron considerados como las variables de respuesta del proceso. Los AGV fueron cuantificados por titulación con NaOH (0.1 N) y la AT por titulación con HCl (0.1 N) (Anderson y Yang, 1992). El pH fue determinado mediante un medidor de pH (pH meter 691 Metrohm) y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de acuerdo al protocolo 4500-NH3D del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). El biogás producido durante el tiempo de experimentación se burbujeó en una solución alcalina (NaOH) con fenolftaleína como indicador y pH 12, en la cual el CO<sub>2</sub> es absorbido. El volumen de solución alcalina desplazada es equivalente al volumen de metano generado por el sistema anaerobio (Angelidaki et al., 2009). El metano se cuantificó en condiciones normales de temperatura y presión mediante la ecuación (1).

$$V_{NTP} = \frac{(P_0 - P)T_0}{P_{atm} \cdot T} \quad \text{ec (1)}$$

Donde,  $V_{NTP}$  es el volumen de gas a condiciones normales (ml),  $V$  es el volumen de gas generado durante el ensayo de biometanización,  $P_0$  es la Presión de metano en condiciones normales (1013.25 mbar),  $T$  es la temperatura de ambiente a la cual se realizó la medición,  $P$  es la Presión de vapor (mbar) a temperatura  $T$  y  $P_{atm}$  es la presión atmosférica del lugar en el cual se llevó a cabo el ensayo. El PBM de la GJ se expresó en términos de volumen normalizado de metano acumulado sobre sólidos volátiles adicionados del sustrato (SV-Ad). El potencial teórico de biometanización (PBM<sub>th</sub>) del sustrato se calculó mediante la estequiometría representada en la ecuación de *Buswell* (2 y 3), la cual asume conversión completa de toda la materia orgánica en biogás (Buswell y Neave, 1930).



$$PBM_{th} = \frac{\left( \frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8} \right) 22.4}{12n + a + 16b + 14c} \left( \frac{m^3 - CH_4}{kg - VS} \right) \quad \text{ec (3)}$$

Donde, 22.4 es el volumen de un mol de gas a condiciones estándar de temperatura y presión. Los resultados experimentales fueron analizados con el software *StatGraphics plus 5.1*, *StatPoint*® Inc. (Virginia, EE.UU). El test de *Fisher's* fue usado para verificar diferencias estadísticas entre los resultados.

## Resultados

**Caracterización fisicoquímica del sustrato e inóculo.** En la tabla 1, se presenta la caracterización fisicoquímica de sustrato e inóculo, la cual se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

El pH del sustrato y del inóculo se encuentra en el rango de operación para el desarrollo de DA reportado en la literatura (Raposo et al., 2006). La materia orgánica del sustrato representada por la concentración de sólidos totales, sólidos volátiles y ácidos grasos volátiles de la gallinaza de jaula, permiten identificarla como una fuente de carbono atractiva para DA.

**Evolución de la etapa acidogénica de la digestión anaerobia de gallinaza de jaula.** La cinética de consumo de AGV durante 30 días de biodegradación, se presenta para las RIS de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 (figura 2). Se observa que para las diferentes relaciones inóculo-sustrato, el inicio del proceso presenta la misma tendencia exponencial; indicando afinidad del inóculo hacia el sustrato (Quintero et al., 2012). Se ha demostrado que concentraciones de AGV superiores a los 6000 mg/L pueden causar inhibición del proceso anaerobio (Castillo et al., 2007), en este estudio la máxima concentración de AGV fue de 5400 mg/L (RIS 1), valor que se encuentra por debajo del límite que ocasionaría inhibición por acidificación. A partir del día 6, la concentración de AGV disminuyó por debajo de 450 mg/L, lo que demuestra alto grado de reducción de materia orgánica y consecuentemente actividad metabólica de los microorganismos acetogénicos, capaces de reducir los AGV hasta acetato (Wang et al., 1999).

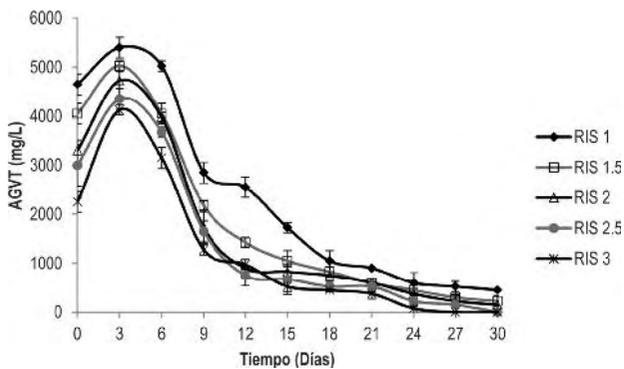
**Estabilidad del proceso anaerobio.** Los procesos anaerobios alcanzan la estabilidad en rangos de AGV/AT entre 0.2-0.8. (Raposo et al., 2011). Relaciones de AGV/AT superiores a 0.8 indican que no hay balance entre la población de microorganismos acidogénicos y metanogénicos (Wan et al., 2011). En la figura 2a, se muestra el cambio en la estabilidad del proceso de digestión anaerobia de la gallinaza para diferentes RIS.

Se demostró que la estabilidad del proceso de digestión anaerobia de gallinaza se favorece a cargas orgánicas inferiores a 16 g SV/l, equivalentes a RIS superiores a 1.0. Sin embargo, durante el inicio del proceso se evidenció inestabilidad en el sistema para todas las relaciones estudiadas con valores de AGV/AT superiores a 0.8. Esto se debe a que las velocidades de

**Tabla 1.** Caracterización fisicoquímica del sustrato e inóculo.

| Parámetro                           | Sustrato | inóculo |
|-------------------------------------|----------|---------|
| pH                                  | 6.3      | 8.5     |
| Sólidos totales (g/L)               | 226.2    | 29.2    |
| Sólidos Volátiles (g/L)             | 107.7    | 20.5    |
| Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> ) | 13467    | 6023    |
| Ácidos grasos volátiles (mg/L)      | 15613    | 1370    |
| Densidad (g/L)                      | 1080     | 1003    |
| C (%P/P)                            | 28.0     | ND      |
| H (%P/P)                            | 2.6      | ND      |
| O (%P/P)                            | 18.4     | ND      |
| N (%P/P)                            | 3.8      | ND      |

ND: No determinado



**Figura 1.** Cinética de consumo de ácidos grasos totales (AGV)

producción de ácidos son mayores a las de consumo de los mismos, razón por la cual la relación AGV/AT se encuentra en los límites de estabilidad para el experimento con RIS de 3. Debido a la capacidad *buffer* del inóculo (0.23, ver tabla 1), el sistema alcanza estabilidad, al noveno día de biodegradación y la relación AGV/AT se conserva en un rango 0.0 y 0.3, el cual es adecuado para operar un proceso a condiciones estables. Estos resultados concuerdan con la estabilidad alcanzada (AGV/AT = 0.4) para la digestión de lodo estiércol bovino y gallinaza diluida al 15% (Callaghan *et al.*, 2002).

La evolución del pH, para las diferentes RIS se presenta en la figura 2b. El pH para las RIS evaluadas osciló en

un rango de entre 7.5 y 8.5, valores adecuados para el crecimiento de consorcios microbianos metanogénicos (Gerardi, 2003). Durante el proceso biodegradativo el pH disminuyó durante los primeros 3 días producto de incrementos en la concentración de AGV. Luego del cuarto día el pH se incrementó gradualmente hasta estabilizarse. Este comportamiento se puede explicar con base a lo reportado por Lay *et al.*, (1998), los sustratos con alta carga orgánica como la GJ tienden a presentar rápidos incrementos en la concentración de AGV causando fuertes descensos en el pH y desestabilizando el reactor. Sin embargo incrementos progresivos en la concentración de amonio aumentan el pH al comportarse como una base (Lay *et al.*, 1998; Yenigun *et al.*, 2013). Angelidaki *et al.*, (2003), describió resultados similares para sistemas con diferentes residuos orgánicos, puntualizando que para el caso de la GJ se pueden presentar interacciones entre la producción de AGV y pH que conducen a un estado de equilibrio.

**Efecto de la concentración de amonio sobre la digestión anaerobia de la gallinaza de jaula.** En la figura 3 se muestra que la variación de la concentración de amonio para cada una de las relaciones evaluadas tiene una tendencia similar. Las concentraciones de amonio son proporcionales a la carga orgánica adicionada. La máxima concentración de amonio (2066 mg/L) se presenta en el arranque del proceso para la RIS de 1.0, que equivale a una carga orgánica de gallinaza de 16.6 g SV/L. El proceso se estabiliza a los 9 días de digestión alcanzando concentraciones de amonio que oscilan entre 225 mg/L y 550 mg/L. Teniendo en cuenta que concentraciones de amonio superiores a 2000 mg/L inhiben el sistema anaerobio; se observa que la

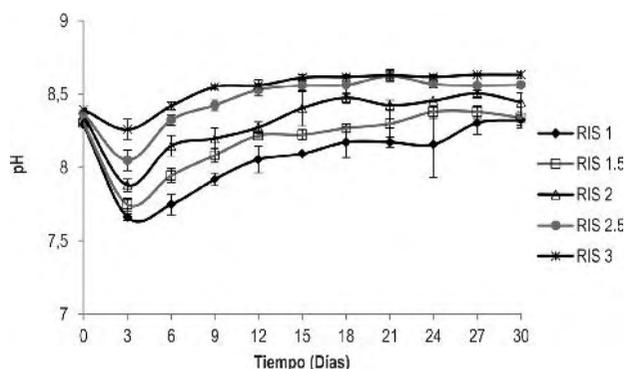
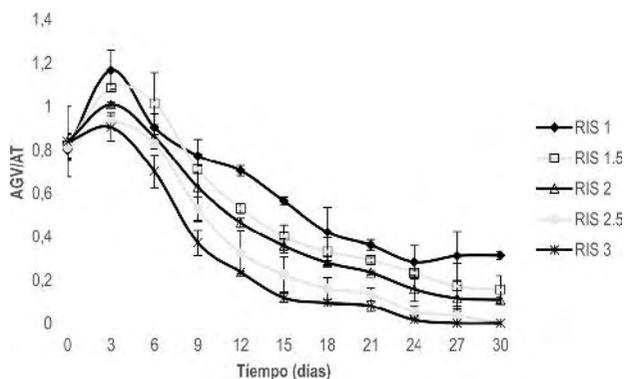


Figura 2. Estabilidad de la digestión anaerobia de la gallinaza de jaula; a) Relación AGV/AT b) pH

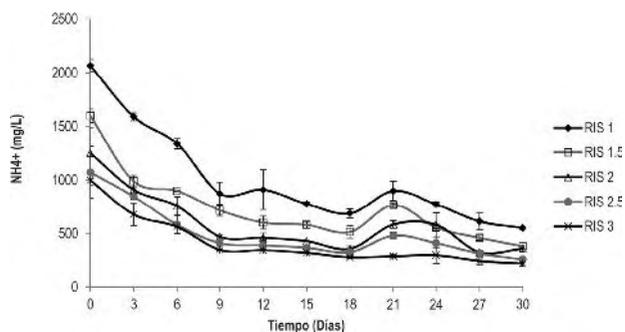


Figura 3. Variación de la concentración de amonio en la digestión anaerobia de la gallinaza de jaula.

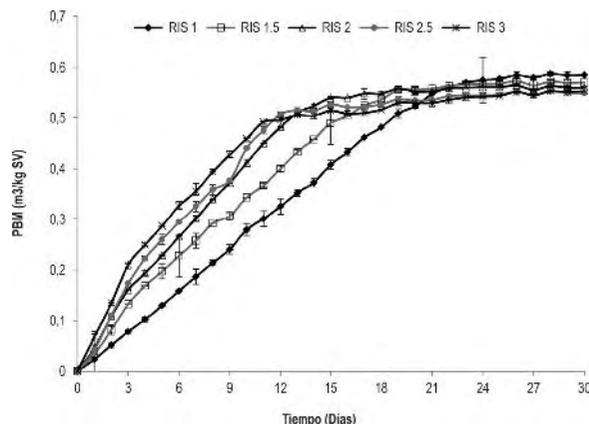


Figura 4. Producción específica de metano a partir de gallinaza de jaula.

digestión anaerobia de gallinaza de jaula no presenta efecto inhibitorio por iones amonio, excepto para cargas orgánicas superiores a 16.6 g SV/l (equivalente a RIS de 1).

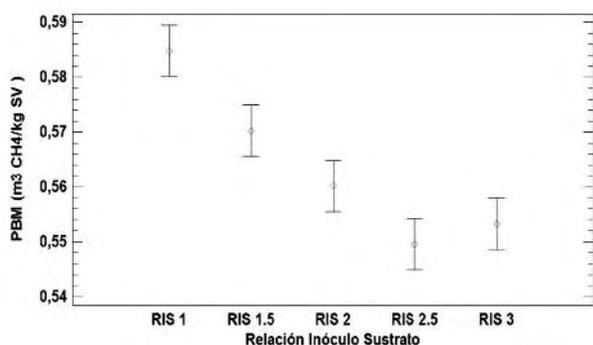
### Biodegradabilidad anaerobia de la gallinaza de jaula.

Según la composición elemental la gallinaza de jaula utilizada en este estudio (%p/p C:28; H:2.6; O:18.4; N:3.8) tiene teóricamente un potencial de biometanización (PBM) de 0.59 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg-SV. La producción específica de metano del inóculo (lodo estiércol bovino) fue de 0.17 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg-SV, este valor se sustrajo de los respectivos PBM para cada uno de los ensayos (figura 4). El máximo PBM fue de 0.58 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg-SV para RIS de 1.0 alcanzando una eficiencia del proceso del 98%. La producción más baja de metano fue de 0.55 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg SV para los valores de RIS de 2.5 y 3.0, que corresponden a cargas orgánicas adicionales de 6.6 g SV/L y 5.5 g SV/L respectivamente. Los valores obtenidos en este estudio son superiores a los reportados por Li *et al.*, (2013), quienes alcanzaron producciones de 0.30 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg-SV a partir de una carga orgánica de 3.0 g SV/L de gallinaza de jaula. Lo anterior indica que el proceso de digestión anaerobia de la gallinaza de jaula presenta altos rendimientos de producción de metano.

La comparación de medias para el PBM de la gallinaza de jaula a las RIS evaluadas (análisis estadístico), mostró que existen diferencias significativas entre cada uno de los experimentos con un valor de  $p = 0.0001$  (figura 5). Por consiguiente, se corrobora que cargas orgánicas inferiores a 17 gSV/L, no inhiben el proceso anaerobio de la gallinaza de jaula, demostrando un efecto inverso entre la carga orgánica de la gallinaza de jaula (expresada en función de la RIS) y el potencial de biometanización de este sustrato.

### Conclusiones

La producción específica de metano a partir de gallinaza de jaula se favorece al operar el proceso con cargas orgánicas inferiores a 17 g SV/L. En consecuencia, las relaciones inóculo (lodo estiércol bovino)/sustrato (gallinaza de jaula) superiores a 1.0 reducen la inhibición de la digestión anaerobia causada por la acumulación de ácidos grasos volátiles y iones amonio; dado que las máximas concentraciones de estos compuestos son 5400 mg/L y 2066 mg/L respectivamente. Como resultado, el potencial de biometanización de la



**Figura 5.** Análisis de medias del potencial de biometanización para la gallinaza de jaula.

gallinaza de jaula es de  $0.58 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg-SV}$ , alcanzando una eficiencia del proceso del 98%.

Dado que a concentraciones de carga orgánica superiores a  $17 \text{ g SV/l}$ , el proceso de digestión anaerobia se inhibe, es recomendable enfocar las investigaciones con gallinaza de jaula hacia la codigestión de este sustrato con residuos industriales ricos en carbohidratos, lípidos y proteínas como por ejemplo melaza de caña, glicerol residual y lactosuero respectivamente.

## Referencias bibliográficas

Anderson, G.K., y Yang, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, 64, 53-59.

Angelidaki, I., y Ellegaard, L. (2003). Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants: status and future trends. *Apply Biochemistry Biotechnology*, 109 (1-3), 95-105.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, D., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., y van-Lier, J.B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*, 59 (5), 934-917.

APHA, (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, ISBN 978-0-87553-047-5.

Buswell, E.G., y Neave, S.L. (1930). Laboratory studies of sludge digestion. Illinois of State Water Survey.

Callaghana, F.J., Wasea, D.A.J., Thayanithya, K., y Forsterb, C.F. (2002). Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass and Bioenergy*, 27, 71-77.

Chynoweth, D.P., Turick, C.E., Owens, J.M., Jerger, D.E., y Peck, M.W. (1993). Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass Bioenergy*, 5, 95-111.

Delgado, H.A. (2011). Farm Animal Welfare in Colombia: A country situation report. Disponible en: [http://portal.fedegan.org.co:7782/portal/page?\\_pageid=93,136296&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://portal.fedegan.org.co:7782/portal/page?_pageid=93,136296&_dad=portal&_schema=PORTAL)

Escalante, H., Orduz, J. y Zapata, L. (2010). Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Unidad de planeación minero energética, Universidad Industrial de Santander, UIS.

Fotidisa, I.A., Kougiassa, P.G., Zaganas, I.D., Kotsopoulos, T.A., y Martzopoulos, G.G. (2014). Inoculum and zeolite synergistic effect on anaerobic digestion of poultry manure. *Environmental Technology*, 35 (10), 1219-1225.

Gerardi, H. (2003). The Microbiology of Anaerobic Digesters. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. USA.

Hashimoto, A.G. (1989). Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and production rate from straw. *Biological Wastes*, 28, 247-255.

Huang, G., Wang, X., y Han L. (2011). Rapid estimation of nutrients in chicken manure during plant-field composting using physico-chemical properties. *Bioresource Technology*, 102, 1455-1461.

Lay, J.J., Li Y.Y., y Noike, T. (1998). The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion. *Water Environment Research*, 70, 1075-82.

Liu, G., Zhang, R., El-Mashad, H.M., y Dong, R. (2009). Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. *Bioresource Technology*, 100, 5103-5108.

Li, Y., Zhang, R., Liu, G., Chen, C., He, Y., y Liu, X. (2013). Comparison of methane production potential, biodegradability, and kinetics of different organic substrates. *Bioresource Technology*, 149, 565-569.

Neves, L., Oliveira, R., y Alves, M.M. (2004). Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. *Process Biochemistry*, 39, 2019-2024.

Niu, Q., Qiao, W., Qiang, H., Hojo, T., y Li, Y. (2013). Mesophilic methane fermentation of chicken manure at a wide range of ammonia concentration: Stability, inhibition and recovery. *Bioresource Technology*, 137, 358-367.

Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, J.B. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*. 13(6):485-92.

Quintero, M., Castro, L., Ortiz, C., Guzmán, C., Escalante, H. (2012). Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. *Bioresource Technology*, 108, 8-13.

Raposo, F., Banks, C.J., Siebert, I., Heaven, S., Borja, R. (2006). Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry*, 41, 1444-1450.

Rosales, L., Bermúdez, J., Moronta, R., Morales, E. (2007). Gallinaza: Un Residual Avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 41-48.

Salminen, E., y Rintala, J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste - a review. *Bioresource Technology*, 83, 13-26.

Wang, H., Gawa, O., Kato, Y. (1999). Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 16: 407-416.

Wan, C., Zhou, Q., Fu, G., Li, Y. (2011). Semi-continuous anaerobic co-digestion of thickened waste activated sludge and fat, oil and grease. *Waste Management*, 31, 1752-1758.

Xie, S., Wu, G., Lawlor, P.G., Frost, J.P., Zhan, X. (2012). Methane production from anaerobic co-digestion of the separated solid fraction of pig manure with dried grass silage. *Bioresource Technology*, 104, 289-297.

Yenigun, O., Demirel, B. (2013). Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review, *Process Biochemistry*, 48, 901-911.

Zeng, S., Yuan, X., Shia, X., Qiu, Y. (2010). Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. *Journal of Hazardous Materials*, 178, 89-93.

# Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.)

## Liquid medium culture: an approach for the commercial micropropagation of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.)

Nilca Rosa Albany de Vilchez\*, Jorge Alberto Vilchez Perozo\*\*, Silvia León de Sierralta\*, Alba Ruth Nava Ferreira\*\*\*, Leonardo Javier Martínez Ferrer\*\* y Miguel Ángel Molina Pulgar\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669

### Resumen

La micropropagación es una alternativa para la producción comercial de plantas de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) limitada por los altos costos de producción. Con el objetivo de prescindir de los agentes gelificantes, reduciendo costos, se comparó el medio de cultivo líquido con el medio de cultivo gelificado en las diferentes etapas de micropropagación de la zábila. En la etapa de establecimiento se observó mayor porcentaje de explantes contaminados en el medio de cultivo líquido estático (25.55 %) que en el medio gelificado (11.11 %); y aunque el resto de los explantes se establecieron independientemente de la condición del medio de cultivo, en el medio líquido alcanzaron mayor altura (3.81 cm) que en el medio gelificado (3.03 cm). En la etapa de multiplicación, la altura de los explantes (entre 4.43 y 6.01 cm) fue superior en los recipientes de inmersión temporal automatizado (RITA®) en comparación con el medio gelificado (entre 3.24 y 3.42 cm); sin diferencias significativas entre el número de brotes/explante. Todos los brotes enraizaron a los 30 días independientemente del medio de cultivo empleado (líquido estático y gelificado), sin observar variaciones en la altura del brote y, número y longitud de las raíces. El empleo de los medios de cultivo líquidos y la implementación de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA® permiten reducir los costos de producción al prescindir de los agentes gelificantes, lo que representa un avance para la micropropagación comercial de zábila.

**Palabras clave:** Cultivo de tejidos, agentes gelificantes, RITA®, sistemas de inmersión temporal.

### Abstract

Micropropagation is considered a successful alternative for aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) plant production. However, it has limited use due to the high production cost. Liquid media were compared to agar-gelled medium during all micropropagation stages of aloe to reduce the cost for gelling agent used. In the establishment stage, there was a higher percentage of contaminated explants in static liquid medium (25.55%) than those cultured in agar-gelled medium (11.11%), although all the explants were established independently of the culture medium used, higher height (3.81 cm) was observed in liquid medium than those growing in agar-gelled medium (3.03 cm). In the multiplication stage, explant height was higher in the recipients used for automated temporary immersion system (RITA®) (4.43 - 6.01 cm) than those cultured in agar-gelled medium (3.24 - 3.42 cm), there was no significant difference for number of shoots/explant. All shoots had roots at 30 days independently of used culture media (static liquid or agar-gelled media). Shoot height, number and root length had similar values in both culture media. The implementation of liquid media and automated temporary Immersion system RITA® may allow to reduce production costs of gelling agent used, it represents an approach for the commercial micropropagation of aloe.

**Keys words:** Tissue culture, gelling agents, RITA®, temporary immersion system.

**Recibido:** junio 15 de 2014

**Aprobado:** abril 13 de 2015

\* Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), Republica Bolivariana de Venezuela. Autor para correspondencia: nalbany@fa.luz.edu.ve, nilca.albany@fa.luz.edu.ve

\*\* Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), Republica Bolivariana de Venezuela.

\*\*\* Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

## Introducción

En los últimos años se ha demostrado científicamente que las plantas del género *Aloe*, poseen gran valor nutricional, medicinal y cosmético (Pellizzoni *et al.*, 2012), siendo *Aloe barbadensis* Miller (zábila), la especie de mayor importancia para la industria por la gran cantidad de acíbar que producen sus hojas, cuyo principio activo es la aloína que tiene múltiples propiedades medicinales (Ramachandra y Srinivasa 2008; Añez y Vásquez 2005).

La propagación convencional de zábila se realiza mediante la separación de brotes o hijuelos de la base de las plantas adultas, teniendo una tasa de reproducción estimada de 3 a 4 brotes por planta al año (Aggarwal y Barna 2004) por lo que se considera muy lenta e insuficiente para satisfacer la demanda a nivel comercial (Meyer y Van Staden 1991).

Diversos métodos para la propagación de zábila basados en las técnicas de cultivo de tejidos se han desarrollado con resultados satisfactorios que incrementan el número de plantas y aceleran la tasa de reproducción (Mukherjee y RoyChowdhury 2008; Supe 2007; Hosseini y Parsa 2007; Matos 2007; Albany *et al.*, 2006; Aggarwal y Barna 2004; Liao *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2000). Sin embargo, la implementación de esta tecnología mediante la micropropagación a escala comercial está seriamente limitada por los altos costos de producción (Savangikar 2004).

Entre los factores involucrados que incrementan los costos en la micropropagación de plantas, se destacan: el elevado número de operaciones manuales que implican un costo entre el 40 y 90 % por mano de obra (Pérez *et al.*, 2000; Etienne y Berthouly 2002; Satyahari 2005), el gasto por energía eléctrica estimado entre el 60 y 65 % de los costos de laboratorio (Ahloowalia y Savangikar 2004; Kodym y Zapata 1999) y el uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo que representan entre el 70 y 90 % de los costos del medio de cultivo (Prakash *et al.*, 2004; Orellana 1998).

La implementación de metodologías de propagación basadas en el empleo de medios de cultivo líquidos que prescinden del agente gelificante, definitivamente reducen los costos de producción (Preil 2005; Aggarwal y Barna 2004). Además, éstos facilitan la absorción de nutrientes por parte de los tejidos, disminuyen el tiempo requerido para el desarrollo de los cultivos (Alcaraz-Meléndez *et al.*, 2002); simplifican las operaciones de preparación y dispensado del medio, permitiendo establecer métodos de control y muestreo en cada etapa y sustentan el desarrollo propuestas para la automatización de los procesos *in vitro* (Satyahari 2005; Etienne y Berthouly 2002).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) fueron concebidos para viabilizar la comercialización de la micropropagación, ya que éstos permiten la automatización o semiautomatización de los sistemas de cultivo (Geor-

giev *et al.*, 2014), además el principio someter al tejido de la planta cultivada a ciclos alternos de inmersión temporal (pocos minutos) en el medio líquido seguido del drenaje y la exposición del tejido a un medio ambiente gaseoso renovado mejoran considerablemente la producción y calidad de los cultivos *in vitro* (Georgiev *et al.*, 2014; Etienne y Berthouly 2005).

Aunque la mayoría de los métodos desarrollados para la micropropagación de zábila se basan en el uso de medios de cultivo con diferentes agentes gelificantes (Matos 2007; Liao *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2000; Roy y Sakar 1991), se han obtenido resultados prometedores con el uso de medios de cultivo líquidos empleando diferentes sistemas como son: estáticos, agitados y con inmersión temporal; todos ellos para la etapa de multiplicación *in vitro* de zábila (Vilchez *et al.*, 2007; Albany *et al.*, 2006; Aggarwal y Barna 2004).

Con el propósito de prescindir del uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo que encarecen los costos de producción de las plantas y limitan la micropropagación comercial de zábila, se comparó el uso del medio de cultivo líquido estático o de inmersión temporal con el medio gelificado en la etapa de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de zábila.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Para iniciar la investigación se seleccionaron hijuelos de zábila sanos de 20 a 30 cm de longitud, de un lote de plantas adultas ubicadas en los canteros del propagador del Vivero de la Universidad del Zulia, Venezuela (10°41'12"LN con 71°38'05"LO a 36 msnm).

### Etapa de Establecimiento *in vitro*

Se diseñó un experimento totalmente al azar con un arreglo aleatorizado para evaluar el efecto del medio de cultivo líquido estático con puente Heller (soporte de filtro de papel) y compararlo con el medio gelificado con 4 g L<sup>-1</sup> de agargel (SIGMA).

Los hijuelos de zábila seleccionados del vivero universitario se sometieron a un primer lavado con agua corriente y jabón líquido comercial, eliminándoles los restos de sustrato y raíces. Seguidamente se realizó el procedimiento de desinfección descrito por Albany *et al.* (2006) y en condiciones asépticas los vástagos de 3 cm de longitud fueron seccionados hasta obtener el explante, constituido de la yema apical del vástago recubierta en la base por 3 a 4 hojas, con una altura promedio de 1 cm y un diámetro de 0.5 cm, aproximadamente.

Los explantes fueron introducidos en tubos de ensayos de 150 x 20 mm (Bellco Glass) cubiertos con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs), que contenían 15 mL de medio de cultivo MS (Mu-

rashige & Skoog 1962) de pH 5.8, suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 25 mg L<sup>-1</sup> de cisteína y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; sin adición de reguladores de crecimiento.

Se establecieron 10 repeticiones de 3 unidades experimentales cada repetición, para un total de 30 explantes en cada tratamiento (medio líquido y medio gelificado). La unidad experimental estuvo representada por un tubo de ensayo con un explante y las variables evaluadas fueron el porcentaje de explantes establecidos a los 7, 14 y 21 días de cultivo y el porcentaje de explantes contaminados y la altura del explante al finalizar el periodo de cultivo (21 días).

### ***Multiplicación in vitro de zábila en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®)***

Para evaluar el efecto del medio de cultivo líquido en la multiplicación *in vitro* de zábila se seleccionaron los envases comerciales denominados RITA® y se comparó con el medio gelificado, ya que éste es el comúnmente utilizado en la multiplicación *in vitro* de zábila (control).

Se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluó la frecuencia de inmersión de cada 6, 8 y 12 h con 1 min de inmersión. En el segundo experimento se evaluó el tiempo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 min con la frecuencia seleccionada del primer experimento de cada 8 h.

En cada experimento se utilizó un diseño experimental totalmente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Para los tratamientos líquidos se agregaron 200 mL de medio de cultivo a los RITA® y para el tratamiento control se agregó 50 mL de medio de cultivo gelificado con 4 g L<sup>-1</sup> de agargel (SIGMA) en frascos de vidrio de 1 L de capacidad.

Se seleccionaron brotes de zábila *in vitro* que poseían entre 2 y 3 cm de longitud con un mínimo de 3 hojas desarrolladas, del cuarto ciclo de multiplicación. En condiciones asépticas se individualizó cada brote y se decapitó a una longitud promedio de 1 cm desde la base hacia el extremo distal de las hojas y se sembraron diez explantes en cada envase.

En los dos experimentos se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 25 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 1 mg L<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; a pH 5.8. Las variables evaluadas fueron el número de brotes/explante y la altura del explante a los 30 días de cultivo.

### ***Enraizamiento in vitro de zábila en medio líquido y gelificado***

Para comparar el efecto del medio líquido y gelificado en el enraizamiento *in vitro* se seleccionaron brotes de zábila de tamaño comprendido entre 3 y 6 cm de altura, procedentes de un séptimo subcultivo de pro-

pagación *in vitro*. A estos brotes se les eliminó toda brotación de yemas laterales y se les realizó un corte transversal del follaje para reducir la altura de los propágulos a 3 cm aproximadamente.

Los explantes fueron colocados individualmente en tubos de ensayo que contenían 15 mL de medio de cultivo líquido estático con puente Heller o gelificado con 4 g L<sup>-1</sup> de agargel (tratamientos). Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) con una reducción del 50% de las sales, suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> mioinositol, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 25 mg L<sup>-1</sup> de cisteína y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; a pH 5.8.

A los 10, 20 y 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de brotes enraizados; y al finalizar el cultivo (30 días) se evaluó la altura de la vitroplanta, el número y longitud de raíces. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con ochenta repeticiones por tratamiento.

### ***Condiciones generales de crecimiento in vitro***

Las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento, se desarrollaron en un cuarto de crecimiento *in vitro* con una temperatura promedio de 26°C±2°C con luz blanca fluorescente continua (40W) y una intensidad de 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Para el análisis estadístico los valores porcentuales de las variables dependientes en la etapa de establecimiento y enraizamiento, fueron transformados a través de la ecuación  $n^{1/2} + 1/2$ , donde n es el valor porcentual.

Los datos de todas las variables dependientes fueron evaluados mediante el análisis de varianza simple y la prueba de comparación de medias por Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa computarizado Statistix versión 8.0 (2003) para ambiente Windows de Microsoft®.

## **Resultados y discusión**

### ***Establecimiento in vitro en medio líquido y gelificado***

El porcentaje de explantes contaminados, la altura del explante y el porcentaje de explantes establecidos a los 7 y 14 días, fueron afectados por la condición del medio de cultivo en la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila. Sin embargo, todos los explantes que sobrevivieron lograron establecerse independientemente del medio de cultivo a los 21 días (tabla 1).

El porcentaje de explantes contaminados observado en el medio gelificado fue duplicado en el medio líquido. La presencia de microorganismos en los medios líquidos puede ser detectada fácilmente por los colores, texturas, turbidez uniforme o no, películas o sedimentos de las sustancias que estos microorganismos segregan en el medio (Alvarado 1998). En los medios gelificados se observó oscurecimiento del medio pro-

**Tabla 1.** Efecto del medio líquido estático con puente Heller y gelificado con agargel sobre el porcentaje de explantes contaminados, porcentaje de explantes establecidos y altura del explante en la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila.

| Condición del medio | Explantes contaminados (%) a los 21 días | Explantes establecidos (%) a los |         |         | Altura del explante (cm) a los 21 días |
|---------------------|--|----------------------------------|---------|---------|--|
|                     |  | 7 días                           | 14 días | 21 días |  |
| Líquido             | 25.55 a                                  | 48.45 a                          | 87.75 a | 100 a   | 3.81 a                                 |
| Gelificado          | 11.11 b                                  | 24.67 b                          | 71.56 b | 100 a   | 3.03 b                                 |

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

bablemente por liberación de fenoles que dificultó la detección de los contaminantes, incrementándose el riesgo de obtener pérdidas en etapas posteriores a la del establecimiento, como la multiplicación. En tal sentido, la necesidad de observar los contaminantes para su eliminación oportuna es un aspecto que debe tomarse en cuenta incluso para elegir el agente gelificante (Capote *et al.*, 2002), los que brindan una apariencia translúcida similar al medio de cultivo líquido (phytagel y gellan gum) son los más costosos.

Se ha evaluado el porcentaje de explantes contaminados en la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila en medios de cultivo gelificado; pero para demostrar la influencia del contenido de sacarosa (Tanabe y Horiuchi 2006) y el efecto del método de desinfección superficial empleado (Albany *et al.*, 2006; Matos *et al.*, 2000). No obstante, el resultado obtenido en esta investigación de 11.11 % de explantes contaminados en el medio gelificado fue similar al reportado por Albany *et al.* (2006) de 9.09 % e inferior al obtenido por Matos *et al.* (2000) con el 24 %. En cuanto al medio líquido no hay precedentes para establecer comparaciones apropiadas; y aunque resultó estadísticamente superior al medio gelificado en este estudio, permitió identificar rápidamente el material contaminado y excluir de forma temprana cualquier fuente de contaminación.

El porcentaje de explantes establecidos a los 7 días de cultivo en el medio líquido fue superior que en el medio gelificado (tabla 1), tendencia que se mantuvo hasta los 14 días de cultivo. Sin embargo, todos los explantes lograron establecerse a los 21 días, independientemente de la condición del medio de cultivo.

Estos resultados parecieran estar relacionados con la facilidad que tienen los tejidos de absorber los nutrientes de los medios líquidos y manifestar crecimiento en poco tiempo; mientras que los medios de cultivo gelificados limitan la absorción de los nutrientes (Lorenzo *et al.*, 1998), ya que éstos pasan a formar parte de la matriz del gel y los explantes requieren mayor tiempo para manifestar crecimiento.

Por otra parte, durante los primeros 7 días de cultivo se observó la presencia de compuestos fenólicos en la base de los explantes en ambos medios de cultivo

(líquido y gelificado); sin embargo, en el medio gelificado se evidenció mayor ennegrecimiento en la superficie de contacto con el medio de cultivo debido a la menor tasa de difusión. El alto contenido de estos compuestos fenólicos causa oxidación en el medio de cultivo (Matos 2007), dificultando el establecimiento de la zábila *in vitro*, ya que estas sustancias fenólicas son reconocidas como inhibidores del crecimiento (Roy y Sakar 1991). Estas razones pudieran estar relacionadas con la disminución del crecimiento de los explantes en los medios de cultivo gelificado durante las primeras semanas de cultivo; contrariamente los explantes del medio líquido lograron contrarrestar los efectos negativos de la oxidación, ya que estos compuestos se diluyen con mayor facilidad en el medio líquido; afectando en menor grado el crecimiento de los explantes.

Hasta el momento, sólo se ha utilizado medio gelificado para el establecimiento *in vitro* de zábila con resultados similares en cuanto al tiempo de crecimiento de los explantes; reportándose después de 15 días (Natali *et al.*, 1990; Matos *et al.*, 2000) y de 4 semanas de cultivo (Liao *et al.*, 2004). Los resultados de esta investigación ponen de manifiesto la eficiencia de los medios de cultivo líquido para la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila.

Al cabo de 21 días de cultivo se observó mayor altura en los explantes establecidos en el medio de cultivo líquido en comparación con el medio gelificado (tabla 1). Esta respuesta está directamente asociada a la absorción de nutrientes sin mayores restricciones en los explantes cultivados en medio líquido.

Resultados similares a esta investigación fueron reportados por Matos *et al.* (2000), Natali *et al.* (1990) y Aggarwal y Barna (2004) con valores que oscilaron entre 2 y 4 cm de altura de explantes de zábila en la etapa de establecimiento, pero después de 30 días de cultivo.

#### **Multiplicación *in vitro* de zábila en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®)**

La frecuencia de inmersión durante la multiplicación *in vitro* de zábila, afectó el número de brotes de los

explantes crecidos en los RITA<sup>®</sup>; resultando mayor cuando se incrementó la frecuencia a 8 y 6 h, sin diferenciarse del número de brotes obtenidos en el medio gelificado. Entre tanto, la altura del explante siempre fue mayor en todas las frecuencias de los RITA<sup>®</sup> que en el medio gelificado (tabla 2).

El tiempo de inmersión en los RITA<sup>®</sup> sólo afectó el número de brotes por explante, obteniendo una mayor brotación en el menor tiempo con un valor promedio similar al control (medio gelificado); mientras que la altura del explante no varió entre los tratamientos en los RITA<sup>®</sup>; pero todas fueron superiores a la alcanzada por los explantes crecidos en el medio gelificado (tabla 3).

Los valores obtenidos para la altura del explante en relación al número de brotes en ambos experimentos de los RITA<sup>®</sup>, parecieran indicar que los nutrientes del medio líquido son asimilados rápidamente por los explantes, evidenciándose en mayor altura del explante en detrimento de la formación de brotes. Esta hipótesis puede ser corroborada con el comportamiento de los explantes en el medio gelificado (control) los cuales mostraron mayor equilibrio entre el crecimiento del explante y el número de brotes emitidos por éstos; como consecuencia de la absorción de los nutrientes sólo por la base del explante y de forma paulatina, debido a la retención que ejerce la matriz del gelificante;

mientras que en los RITA<sup>®</sup> el contacto intermitente del medio nutritivo con los explantes le proporciona una capa delgada de medio que se adhiere en toda la superficie del explante por cohesión y se renueva con cada inmersión.

Al respecto se ha demostrado que las condiciones de los sistemas de inmersión temporal (SIT) y de los medios líquidos en agitación orbital favorecen un mayor crecimiento de tallos y hojas que no son aprovechables para la etapa de multiplicación (Albany *et al.*, 2006 y 2005).

En la multiplicación *in vitro* de zábila, se ha señalado una mayor altura del explante en medios de cultivo líquidos en agitación orbital (50 rpm) en comparación al medio gelificado con 3.85 y 2.83 cm, respectivamente y similar coeficiente de multiplicación entre ambos tipos de medio de cultivo con 3.75 brotes por explante (Albany *et al.*, 2006). Mientras que Aggarwal y Barna (2004) compararon el medio de cultivo líquido estático con el medio gelificado; obteniendo 5.1 brotes por explante en los medios líquidos y 4.8 brotes/explante en los medios gelificados.

Cabe destacar que el origen de las diferencias entre el número de brotes obtenidos en esta investigación y los señalados con anterioridad, se debe principalmente a las diferencias entre las formas de cultivo líquido

**Tabla 2.** Efecto de la frecuencia (6, 8, 12 h) con 1 min de inmersión en los RITA<sup>®</sup> sobre el número de los brotes/explante y la altura del explante en la etapa de multiplicación *in vitro* de zábila.

| Frecuencia de inmersión (h) | Número de brotes/explante | Altura del explante (cm) |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 12                          | 2.12 b                    | 5.87 a                   |
| 8                           | 2.86 a                    | 6.01 a                   |
| 6                           | 2.99 a                    | 5.97 a                   |
| Medio gelificado (control)  | 3.02 a                    | 3.42 b                   |

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

**Tabla 3.** Efecto del tiempo de inmersión (1, 2, 3 y 4 min) con una frecuencia de cada 8 h en los RITA<sup>®</sup> sobre el número de los brotes/explante y la altura del explante en la etapa de multiplicación *in vitro* de zábila.

| Tiempo de inmersión (min)  | Número de brotes/explante | Altura del explante (cm) |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1                          | 2.93 a                    | 4.86 a                   |
| 2                          | 2.42 b                    | 5.01 a                   |
| 3                          | 2.33 b                    | 4.43 a                   |
| 4                          | 2.16 b                    | 4.56 a                   |
| Medio gelificado (control) | 3.16 a                    | 3.24 b                   |

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

empleado, relacionadas con el RITA<sup>®</sup>, el medio líquido estático (Aggarwal y Barna 2004) y en agitación orbital (Albany *et al.*, 2006). Además, la composición de los medios de cultivo utilizados y la manera de medir la variable con seguridad afianzaron las diferencias.

Estudios realizados por Vilchez *et al.* (2007) en la multiplicación *in vitro* de zábila demuestran que una frecuencia de 3 veces al día durante 2 min, permite obtener mayor número de brotes en los RITA<sup>®</sup> (2.75) y al variar los tiempos de inmersión (1, 2 y 3 min) no se reportaron diferencias para el número de brotes; pero sí mayor longitud del explante (5.01 cm) en los RITA<sup>®</sup> con 1 min de inmersión tres veces al día. Estos resultados son similares a los mostrados en esta investigación con las frecuencias de 8 y 6 h, que arrojaron los mayores valores de brotes por explante con 2.86 y 2.99, respectivamente; y cuando se variaron los tiempos de inmersión (1, 2, 3 y 4 min) se observó mayor número de brotes (2.93) en inmersiones de 1 min cada 8 h, con similar altura entre los explantes de los RITA<sup>®</sup>.

#### **Enraizamiento *in vitro* de zábila en medio líquido y gelificado**

Transcurridos 30 días de cultivo en la etapa de enraizamiento, las variables altura de la vitroplanta, el número y la longitud de las raíces; no mostraron diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) por efecto del medio líquido en comparación con el medio gelificado. El porcentaje de explantes enraizados, mostró diferencias por efecto de la condición del medio de cultivo sólo a los 10 y 20 días de cultivo (tabla 4).

Durante los primeros días de cultivo fue notoria la diferencia en el crecimiento de los brotes cultivados en el medio líquido; corroborando de esta manera la facilidad que tienen los explantes de absorber los nutrientes del medio líquido en comparación con el medio gelificado.

A los 10 días de cultivo, el porcentaje de brotes enraizados en el medio líquido duplicó el valor porcentual alcanzado en el medio gelificado. Sin embargo, a los 20 días de cultivo disminuyó esta diferencia; pero se mantuvo mayor porcentaje de brotes enraizados en el

medio líquido. Treinta días después, los brotes colocados en medios gelificados (figura 1a) y líquidos (figura 1b) enraizaron casi en su totalidad, eludiendo las diferencias estadísticas existentes entre ellos.

Este comportamiento pudiera estar relacionado con la mayor resistencia que proporciona la matriz del medio gelificado a los brotes sin raíces para absorber los componentes del medio de cultivo, en comparación con el medio líquido. Es evidente que durante los primeros días de cultivo, los brotes colocados en el medio líquido comienzan a absorber rápidamente los nutrientes, por lo que se agotan estos nutrientes del medio de cultivo con la misma velocidad. Razón por la cual a medida que transcurre el tiempo de cultivo, comienza a disminuir la diferencia entre el porcentaje de brotes enraizados en el medio líquido con respecto al medio gelificado.

Al respecto, Tanabe y Horiuchi (2006), señalan que la concentración del gelificante influye en la capacidad de las plántulas de zábila en absorber agua y otros componentes del medio de cultivo. Estos investigadores demostraron que el porcentaje de ganancia de peso de las plántulas aumentó a medida que se disminuyó la concentración del gelificante, obteniendo 74 % de ganancia de peso con 4 g L<sup>-1</sup> de gellan gum.

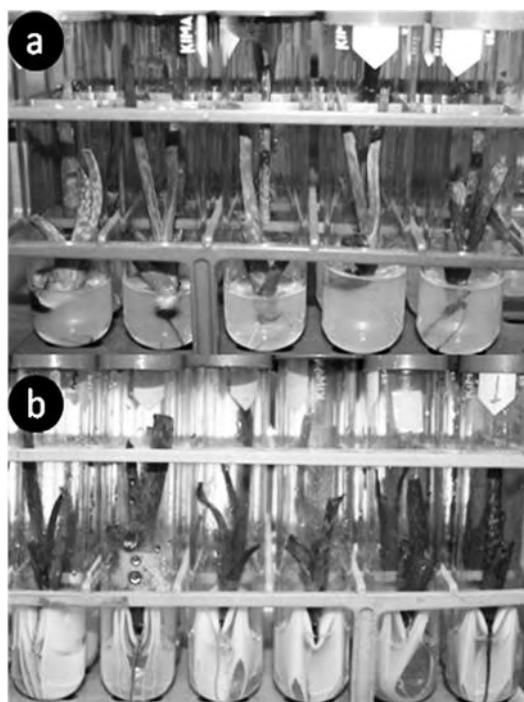
Por otra parte, Orellana (1998) señala que el uso del medio de cultivo líquido permite la difusión de los residuos tóxicos de las vitroplantas, principalmente los compuestos fenólicos que son abundantes durante la iniciación de las raíces en la etapa de enraizamiento y disminuyen el período de las plantas para ser llevadas a la etapa de aclimatación. Además Gangopadhyay *et al.* (2002), afirman que existe una alta frecuencia de dañar las raíces al momento de extraerlas del medio gelificado para el trasplante, y cuando quedan restos del gelificante sobre las raíces puede favorecer el crecimiento de hongos y bacterias.

En los trabajos del género *Aloe*, se observa una alta capacidad de enraizamiento por parte de los brotes *in vitro* de zábila al utilizar diferentes agentes gelificantes con la adición o no de auxinas al medio de cultivo. Al respecto Meyer y Van Staden (1991), reportaron el

**Tabla 4.** Efecto del medio líquido-estático y gelificado con agargel sobre el porcentaje de brotes enraizados, altura de la vitroplanta, número y longitud de las raíces en la etapa de enraizamiento *in vitro* de zábila.

| Condición del medio | Brotes enraizados (%) a los |         |         | A los 30 días de cultivo      |                  |                             |
|---------------------|-----------------------------|---------|---------|-------------------------------|------------------|-----------------------------|
|                     | 10 días                     | 20 días | 30 días | Altura de la vitroplanta (cm) | Número de raíces | Longitud de las raíces (cm) |
| Líquido             | 42.65 a                     | 72.76 a | 100 a   | 7.54 a                        | 1.65 a           | 3.73 a                      |
| Gelificado          | 21.34 b                     | 59.53 b | 98.96 a | 7.33 a                        | 1.79 a           | 3.98 a                      |

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.



**Figura 1.** Brotes enraizados *in vitro* de zábila obtenidos a los treinta días de cultivo. En sistemas de medio gelificado con 4 g L<sup>-1</sup> de agargel (a). En medio líquido estático con puente Heller (b).

100 % de brotes de zábila enraizados con una altura entre 5 y 6 cm utilizando IBA como fuente auxínica y el gelrite como agente gelificante. A diferencia de Natali *et al.* (1990) quienes utilizaron un medio de cultivo sin auxinas y gelificado con agar, pero igual obtienen el 100 % de enraizamiento a los 7 y 10 días de cultivo; tiempo similar (10 días aproximadamente) en el que Matos *et al.* (2000) en un medio de cultivo sin hormonas y con gellan como agente gelificante lograron el enraizamiento de zábila, mientras que Aggarwal y Barna (2004) después de 15 días de cultivo obtienen 100 % de brotes enraizados de zábila en medios de cultivo gelificados con agar y sin auxinas.

Los resultados anteriormente señalados indican que los brotes de zábila tienen un alto potencial de formar raíces adventicias, corroborándose en esta investigación tanto en los medios de cultivo líquido como en los gelificados. Ahora bien, en función del objetivo de esta investigación en disminuir de los costos de producción es pertinente destacar la eficiencia alcanzada en esta etapa, al obtener el 100 % de los brotes de zábila enraizados en un medio de cultivo sin agente gelificante, reguladores de crecimiento y con una reducción al 50 % de las sales de MS.

Esta investigación constituye el primer aporte científico del uso de medio de cultivo líquido en zábila para la etapa de establecimiento *in vitro* y el segundo señalamiento de empleo de RITA<sup>®</sup> en la etapa de multiplicación y de medio líquido estático en la etapa de

enraizamiento; con resultados satisfactorios en todos los casos.

### Conclusiones

La micropropagación de *Aloe barbadensis* Mill. basada en medio de cultivo líquido es más sencilla y satisfactoria que los medios gelificados, con altas posibilidades de automatizar el proceso *in vitro* para fines comerciales.

El medio de cultivo líquido-estático con puente Heller empleado en la etapa de establecimiento y enraizamiento *in vitro* favorece el crecimiento y regeneración de los brotes de zábila, resaltando la reducción de los costos de los componentes del medio de cultivo que conlleva la omisión del gelificante y la exclusión de reguladores de crecimiento y reducción del 50 % de sales de MS en el medio de cultivo de enraizamiento en ambas etapas.

La multiplicación *in vitro* en los sistemas de inmersión temporal tipo RITA<sup>®</sup> facilitan la absorción de los nutrientes por parte de los explantes de zábila traduciendo en mayor crecimiento, al tiempo que se reducen los costos del medio de cultivo y abren la posibilidad de estudiar otros factores para aumentar el número de brotes en esta etapa.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Vene-

zuela por el financiamiento otorgado para la ejecución de esta investigación.

## Referencias bibliográficas

- Acurero, A. (2007). Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (Zábila). *Ciencia*, 15(3): 319-330.
- Aggarwal, D., y Barna, K. S. (2004). Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 13(1), 77-79.
- Ahloowalia B., y Savangikar V. (2004). Plant tissue culture. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. (pp. 41-45). Austria: Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA)
- Albany, N. R., Vilchez, J. A., García, L., y Jiménez, E. (2005). Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 83(3), 357-361.
- Albany, N., Vilchez, J., de Sierralta, S. L., Molina, M., y Chacín, P. (2006). Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(2), 213-222.
- Alcaraz-Meléndez, L., Real-Cosío, S., y Robert, M. L. (2002). Morphological comparison of damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) regenerated *in vitro* from leaves cultured in solidified medium and liquid cultures. *Scientia horticultrae*, 96(1), 293-301.
- Alvarado Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En J.N. Pérez-Ponce (Ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología (pp. 81-104). Santa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Añez, B., y Vásquez, J. (2005). Efecto de la densidad de población sobre el crecimiento y rendimiento de la zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(1), 1-12.
- Rodríguez, A. C., Villanueva, F. Á., Mayor, Z. F., de la Torre, Y. R. S., Díaz, O. P., y Acosta, D. F. (2002). Evaluación de un agente gelificante cubano, Natugel, en el cultivo *in vitro* de plántulas de tomate. *Biotechnología Aplicada*, 19(1), 37-40.
- Etienne, H., y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Etienne, H., y Berthouly, M. (2005). Temporary immersion systems: a new concept for used liquid medium in mass propagation. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Compilado por: Hvoslef-Eide A. y Preil W. Fifth edition. Dordrecht, The Netherlands. pp 165-195. Springer.
- Gangopadhyay, G., Das, S., Mitra, S. K., Poddar, R., Modak, B. K., y Mukherjee, K. K. (2002). Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(3), 301-310.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., y Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621.
- Hosseini, R., y Parsa, M. (2007). Micropropagation of *Aloe vera* L. grown in south Iran. *Pakistan journal of biological sciences: PJBs*, 10(7), 1134-1137.
- Kodym, A., y Zapata-Arias, F. J. (1998). Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(2), 141-145.
- Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X., y Tang, K. (2004). Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 83-86.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., y Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(3), 197-200.
- Matos, A., Molina, J., y Acosta, D. (2000). Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. *Ciencia*, 8(3), 280-284.
- Meyer, H. J., y Van Staden, J. (1991). Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 26(3), 167-171.
- Mukherjee, A., y RoyChowdhury, B. (2008). The *in vitro* propagation of *Aloe vera*. *Techno India Group Research Journal*, 1(2), 116-119.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Natali, L., Sanchez, I. C., y Cavallini, A. (1990). *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. *Plant cell, tissue and organ culture*, 20(1), 71-74.
- Orellana P. (1998). Propagación vía organogénesis. En J.N. Pérez-Ponce (Ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología (pp. 151-178). Santa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Pellizzoni, M., Kalhotka, L., y LUCINI, L. (2012). Antimicrobial activity of different *Aloe barbadensis* Mill. and *Aloe arborescens* Mill. leaf fractions. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6(6), 1975-1981.
- Pérez, J. N., Suárez, M., y Orellana, P. (2000). Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biotecnología Vegetal*, 1, 3-12.
- Prakash S., Hoque M. y Brinks T. (2004). Culture media and containers. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (pp. 29-40). Austria: Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En A.K. Hvoslef-Eide y W. Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation (pp. 1-18). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Ramachandra, C. T., y Rao, P. S. (2008). Processing of *Aloe vera* leaf gel: a review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(2), 502-510.
- Roy, S. C., y Sarkar, A. (1991). *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia Horticultrae*, 47(1), 107-113.
- Satyahari D. (2005). Cost-effective mass cloning of the plants in liquid media using a novel growtek bioreactor. En A.K. Hvoslef-Eide y W. Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation (pp. 127-141). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Savangikar V. (2004). Role of low cost options in tissue culture. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (pp. 11-15). Austria: Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Statistix, 8. 2003. Statistix 8: Analytical Software User's Manual. Tallahassee, Florida, U.S.A.
- Supe, U. J. (2007). *In vitro* regeneration of *Aloe barbadensis*. *Biotechnology*, 6(4), 601-603.
- Tanabe, M. J., y Horiuchi, K. (2006). *Aloe barbadensis* Mill. *ex vitro* autotrophic culture. *Journal of Hawaiian and Pacific Agriculture*, 13, 55-59.
- Ujjwala J. 2007. *In vitro* regeneration of *Aloe barbadensis*. *Biotechnology* 6: 601-603.
- Vilchez, J., Ferrer, O., y Albany, N. (2007). Multiplicación *in vitro* de zábila en sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(01), 78-82.

# Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea spp* por crecimiento mínimo

## Optimization of *in vitro* conservation of *Dioscorea spp* germplasm by minimal growth

Lucía Candelaria Díaz Narváez\*, Oscar Elías Carmona Wilches\*\*,  
Javier Darío Beltrán Herrera\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50842

### Resumen

El ñame Criollo (*Dioscorea alata*) y el ñame Espino (*Dioscorea rotundata*) se constituyen como las dos especies mayormente cultivadas en el departamento de Sucre, Colombia. Por esta razón en la Universidad de Sucre se han implementado técnicas para lograr su conservación mediante la propagación *in vitro*, sin embargo esta metodología conserva las accesiones por un periodo no mayor a los 4 meses, provocando continuos subcultivos, aumento de costos y mano de obra. Por ello la presente investigación tuvo como objetivo establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones (*D. alata* y *D. rotundata*) pertenecientes al banco de germoplasma de la Universidad de Sucre, durante un periodo de 8 meses. Esto mediante la modificación del medio de cultivo base MS; con los siguientes osmolitos: sacarosa, manitol y sorbitol. Se evaluaron 8 tratamientos (T) en los siguientes porcentajes T<sub>1</sub> (control) (3:0:0), T<sub>2</sub> (0:1,5:0), T<sub>3</sub> (0:0:2), T<sub>4</sub> (0:1,5:2), T<sub>5</sub> (0:0:1) y T<sub>6</sub> (0:0:3), T<sub>7</sub> (0:1,5:1) y T<sub>8</sub> (0:1,5:3). Cada 30 días se evaluó: supervivencia (%), hojas expandidas (%), longitud del tallo y raíz, número de nudos y raíces, oxidación (%), senescencia foliar (%) y callo (%). Los resultados mostraron que las especies *D. alata* y *D. rotundata*, se conservan de forma óptima, en la combinación T<sub>4</sub> (0:1,5:2), donde se evidencia un alto porcentaje de supervivencia, un mínimo porcentaje de senescencia foliar y un desarrollo restringido en el resto de variables. Garantizando así la disponibilidad y el desarrollo normal de las accesiones en un periodo superior a 4 meses.

**Palabras clave:** ñame, manitol, sorbitol, sacarosa.

### Abstract

*Dioscorea alata* cv. "Criollo" and *Dioscorea rotundata* cv. "Espino" are constituted as the two cultivars mostly cultivated in the department of Sucre, Colombia. For this reason the University of Sucre has been implementing tissue culture techniques for their multiplication throughout *in vitro* propagation. However, this methodology support accessions for a period about 4 months, causing continuous subcultures, increased costs and labor. Therefore the objective of the present investigation was to establish an optimal culture media for *in vitro* minimal growth conservation of different accessions (*D. alata* and *D. rotundata*) from the University of Sucre yam's genebank, for a period of 8 months by modifying the basic MS culture medium. The following osmolytes were used: sucrose, mannitol and sorbitol in different percentages (S:M:S). Eight treatments (T) in the following percentages were evaluated: T<sub>1</sub> (control) (3:0:0), T<sub>2</sub> (0:1,5:0), T<sub>3</sub> (0:0:2), T<sub>4</sub> (0:1,5:2), T<sub>5</sub> (0:0:1) y T<sub>6</sub> (0:0:3), T<sub>7</sub> (0:1,5:1) y T<sub>8</sub> (0:1,5:3). Every 30 days data was recorded for: survival (%), expanded leaves (%), length of stem and roots, number of leaves and roots, phenolization (%), leaf senescence (%) and callus presence (%). The best results for *D. alata* and *D. rotundata*, were observed in treatment T<sub>4</sub> (0:1,5:2), where a high percentage of survival evidence, a minimum percentage of leaf senescence and a limited response for the other variables. Therefore, these results indicate the potential of this media, to increase 100% *in vitro* growth conservation over the conventional media, and ensuring the viability and normal development of the accessions for more than four months period.

**Key words:** yam, mannitol, sorbitol, sucrose.

**Recibido:** junio 10 de 2014

**Aprobado:** marzo 26 de 2015

\* Bióloga. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. lucadina@537hotmail.com

\*\* Biólogo. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. menfis2226@hotmail.com

\*\*\* Phd. Fitopatología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. darbelt2003@yahoo.com

## Introducción

*Dioscorea* es uno de los seis géneros pertenecientes a la familia *Dioscoreaceae* que comprende más de 650 especies distribuidas en las zonas tropicales de alta pluviosidad (Thurston, 1998). El ñame *Dioscorea* sp, es un tubérculo de gran importancia para los pequeños productores de la región caribe colombiana, de este cultivo dependen numerosas familias de agricultores de esta región (Reina, 2012), y desarrollo de mercados en el marco de los tratados de libre comercio (TLC). Por lo cual desarrollar investigaciones orientadas a la comprensión de sus características y a buscar soluciones a los problemas presentados por el cultivo es de vital relevancia.

En el departamento de Sucre las especies más cultivadas son el ñame "Espino" (*Dioscorea rotundata*) y el ñame "Criollo" (*Dioscorea alata*), con un 75% de la cantidad total cultivada (Reina, 2012). En esta zona del país el ñame se produce de forma vegetativa mediante el fraccionamiento de los tubérculos, ocasionando, en algunos casos, la transferencia de enfermedades de un ciclo a otro y de una localidad a otra. (Rodríguez, et al., 2008). Por ello surgió la iniciativa de implementar nuevas metodologías para la conservación de estas especies, tal como el cultivo *in vitro*. A través de esta metodología la Universidad de Sucre estableció un banco de germoplasma en el cual se resguardan las especies anteriormente mencionadas.

La conservación de este cultivo en un banco de germoplasma constituye la solución a los problemas presentados por el cultivo en campo. Existen reportes sobre micropropagación de algunos ñames comestibles como *D. rotundata* cv. "Espino" (Acosta y Beltrán, 2001); *D. alata* cv "Pico de Botella" (Rodríguez y Beltrán, 2001); embriogénesis somática en *D. alata* cv "Diamante 22" (Espitia y Quintero, 1999) (citados en Salazar, 2002). Sin embargo, el cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp presenta desventajas tales como períodos cortos entre subcultivos (3 a 4 meses), que traen como consecuencia el aumento de costos y uso de mano de obra, afectando la estabilidad genética de las accesiones y comprometiendo la asepsia de las mismas (Acedo y Arradoza, 2006).

En este sentido fue necesario aplicar un nuevo método de conservación que permitiera extender los periodos de subcultivo y así evitar la pérdida del material, el aumento de costos y mano de obra. Este método es denominado conservación bajo crecimiento mínimo, con el cual se logra restringir de forma directa el crecimiento y desarrollo de una planta mediante el estrés osmótico controlado que generan algunos componentes del medio de cultivo, tales como los azúcares y azúcares de alcohol en combinación con parámetros ambientales controlados (Neiva y Jiménez, 2010). Existen reportes de conservación en *Dioscorea*, spp como "*Dioscorea alata* L, clon "Cara-

queño" (Borges et al., 2009), en este estudio lograron conservar y regenerar plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de *D. alata* L clon caraqueño durante 9 y 12 meses, con diferentes concentraciones de manitol, sacarosa y BAP, también se han realizado estudios en otras especies como "*Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. bulbiifera* y *D. trifida*" (Carmona, et al., 2013), lograron conservar cuatro especies *in vitro* de ñame a partir de la combinación de sacarosa, manitol y sorbitol por un periodo superior a seis meses. Estos métodos han sido exitosos, sin embargo en esta última investigación las especies respondieron de forma distinta a los diferentes tratamientos, de tal manera que cada especie tenía un medio en el cual se mantuvo bajo las condiciones de conservación adecuadas durante la investigación.

Por las razones anteriormente expuestas este trabajo tuvo como objetivo establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones pertenecientes al Banco de Germoplasma de ñame de la Universidad de Sucre. Esto durante un periodo de 8 meses y con base en la modificación del medio de cultivo con distintos niveles de manitol y sorbitol de forma individual y combinada.

## Materiales y métodos

### Ubicación geográfica

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja. Esta se ubica en la ciudad de Sincelejo, cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Ortega et al. (2011).

### Técnicas y procedimientos generales

#### Obtención del material vegetal

Se prepararon medios de micropropagación para el establecimiento de las plantas madre. Estos consistieron en sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), sacarosa 30 g/L, carbón activado 2 g/L, ANA 0,5 mg/L, BAP 4 mg/L, tiamina 1mg/L, mioinositol 0,1g/L, agar 8 g/L, para *Dioscorea alata*. Para *Dioscorea rotundata* se prepararon medios con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), sacarosa 30 g/L, carbón activado 2 g/L, ANA 0,1 mg/L, BAP 0,3 mg/L, tiamina 1 mg/L, mioinositol 0,1g/L, y agar 3,25 g/L.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 y se distribuyó en frascos de 182 cm<sup>3</sup>, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó por 20 min. a 15 psi y 121 °C. Los medios se observaron 7 días, antes de su uso, para descartar contaminación preliminar.

Se sembraron 3 segmentos por frasco, provistos de nudos y hojas de plantas donantes del banco de germoplasma del laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad de Sucre. Las actividades de preparación de equipos, esterilización de materiales y medios de cultivo, se desarrollaron bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar horizontal (Astrocel®), en condiciones controladas de temperatura e iluminación.

### **Siembra de los explantes y condiciones del cultivo**

Se emplearon segmentos uninodales (desprovistos de hojas y raíces) con una longitud aproximada de 1 cm, los cuales se obtuvieron a partir de las plantas madre micropropagadas, a los 3 meses de su establecimiento. Los segmentos se sembraron obedeciendo a la polaridad de la planta a razón de un explante por frasco bajo cabina de flujo laminar horizontal en condiciones asépticas. Finalmente se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de  $28 \pm 5$  °C, humedad relativa de 65 % y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### **Conservación in vitro**

#### **Medios de cultivo**

Estuvieron compuestos por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), carbón activado 1g/L, ANA 0,5 mg/L, BAP 4 mg/L, tiamina 1mg/L, mioinositol 0,1g/L, agar 8 g/L, para *Dioscorea alata*. Para *Dioscorea rotundata* se prepararon medios con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), carbón activado 1g/L, ANA 0.1 mg/L, BAP 0.3 mg/L, tiamina 1.0 mg/L, mioinositol 0.1g/L, y agar 8g/L. El medio se modificó con distintas concentraciones de sacarosa (%), manitol (%) y sorbitol (%) de forma individual y combinada. Conformando los siguientes tratamientos: T1 (3:0:0); T2 (0:1,5:0); T3 (0:0:2); T4 (0:1,5:2); T5 (0:0:1); T6 (0:0:3); T7 (0:1,5:1); y T8 (0:1,5:3). Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5,8, luego se disolvió el agar durante 10 min. en una plancha de calentamiento y se distribuyó en frascos de 182 cm<sup>3</sup>, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó en autoclave (Sterilof®), durante 20 min a 15 Psi y 121 °C de temperatura. Los medios se mantuvieron durante 7 días (máximo), antes de su uso para descartar cualquier contaminación de los mismos. Los medios de los diferentes tratamientos se sembraron en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar horizontal (Astrocel®).

#### **Evaluación de la conservación**

Se evaluaron cada 30 días, y en un periodo de 8 meses las siguientes variables.

- Longitud del tallo (se midió en centímetros con una regla milimetrada, desde la base del explante hasta el último nudo).

- Longitud de la raíz más larga. (cm).
- Número de nudos por explante.
- Número de raíces.
- porcentaje de hojas verdes expandidas (número de hojas expandidas/número de hojas totales).
- Porcentaje de hojas muertas (número de hojas muertas/número de hojas totales).
- Porcentaje de callo. (número de plantas *in vitro* que generaron callo/ número de plantas totales)
- Porcentaje de oxidación. (número de plantas *in vitro* con oscurecimiento en el tejido/ número de plantas totales). Se evaluó por observación visual.
- Porcentaje de Supervivencia. (número de plantas *in vitro* vivas/ número de plantas totales), Estrada et al. (2009).

### **Diseño y análisis estadístico**

Esta investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA), formado por 8 tratamientos, con 3 repeticiones y 8 réplicas. A los datos obtenidos se les aplicaron las pruebas de normalidad (ShapiroWilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, aquellas variables distribuidas de forma normal y homogénea fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiples de medias Tukey ( $\alpha$ : 0.05), mientras que en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows. (De Mendiburu, 2012).

### **Resultados y discusión**

#### **Experimento 1: Efecto del manitol y sorbitol en la conservación in vitro de *Dioscorea alata*.**

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten afirmar que el uso de los diferentes agentes osmóticos afecta la supervivencia *in vitro* de la especie *D. alata*. En este sentido, no es aconsejable el uso individual de manitol en el medio de cultivo de esta especie ya que ocasiona la muerte de todos los explantes. Posiblemente esto se deba a una baja disponibilidad de nutrientes y de carbono, debido a la poca absorción de agua por parte de la planta por la reducción del potencial hídrico del medio de cultivo, producto de la adición de dicho osmorregulador. Este fenómeno ha sido observado por Cárdenas y Villegas (2002), quienes encontraron que el uso de manitol como osmorregulador genera potenciales osmóticos más negativos en comparación al sorbitol (tabla 1).

**Tabla 1.** Porcentajes de supervivencia, hojas expandidas, muertas, callo y oxidación en *Dioscorea alata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

| Trat           | Supervivencia (%) | Hojas expandidas (%) | Hojas muertas (%) | Callo (%) | Oxidación (%) |
|----------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------|---------------|
| T <sub>1</sub> | 91,07 ab          | 85,25 ab             | 5,98 abc          | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>2</sub> | 0,00 c            | -                    | -                 | -         | -             |
| T <sub>3</sub> | 90,48 ab          | 72,06 b*             | 15,98 a           | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>4</sub> | 100,00 a*         | 95,83 a              | 0,35 c*           | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>5</sub> | 75,00 b           | 85,43 ab             | 11,65 a           | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>6</sub> | 100,00 a*         | 88,00 ab             | 6,91 ab           | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>7</sub> | 62,50 bc          | 83,47 b*             | 3,08 bc           | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>8</sub> | 76,19 bc          | 82,34 b*             | 4,52 abc          | 0,00      | 0,00          |
| TEST           | Kruskal           | Kruskal              | Kruskal           | No aplica | No aplica     |

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para  $p < 0,05$ , Donde (\*): atributo deseable para la conservación *in vitro* y (-) valor ausente debido a la muerte de los explantes.

|                                       |                                       |                        |
|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| <b>T1: Sacarosa 3%</b>                | <b>T2: Manitol 1,5%</b>               | <b>T3: Sorbitol 2%</b> |
| <b>T4: Manitol 1,5% + Sorbitol 2%</b> | <b>T5: Sorbitol 1%</b>                | <b>T6: Sorbitol 3%</b> |
| <b>T7: Manitol 1,5% + Sorbitol 1%</b> | <b>T8: Manitol 1,5% + Sorbitol 3%</b> |                        |

Por otra parte, el uso de sorbitol (3%) o la combinación manitol-sorbitol (1,5-2%), permiten alcanzar las mayores tasas de supervivencia, por lo cual es posible asegurar la disponibilidad de este cultivo a quien lo necesite. La explicación a este fenómeno está asociada a la capacidad del sorbitol de generar un estrés osmótico menos severo que otros osmorreguladores y a su utilidad como fuente de energía para los explantes (tabla 1).

Al evaluar el porcentaje de hojas expandidas, se encontró que esta variable responde de forma diferente a los tratamientos empleados, siendo T<sub>3</sub>, T<sub>7</sub> y T<sub>8</sub>, quienes obtuvieron los menores valores. Asimismo, también se observaron diferencias en cuanto al tamaño de las hojas, siendo las generadas por los medios de cultivo con sacarosa y sorbitol de mayor tamaño que las obtenidas cuando se empleó manitol, probablemente esto se deba a la falta de nutrientes para el desarrollo de estas estructuras (tabla 1).

Con respecto a la senescencia foliar, el uso de la combinación manitol-sorbitol (1,5-2%), resulta ser la más apropiada, ya que la aparición de tejido foliar muerto es casi nula, debido posiblemente al desarrollo limitado que tienen los explantes creciendo en estas condiciones. Adicionalmente, se debe tener en cuenta el efecto potenciador del sorbitol sobre la necrosis del tejido foliar, especialmente cuando se usa individual-

mente. Resultados similares fueron obtenidos por Carmona, *et al.* (2013), quienes encontraron que el uso de la combinación manitol-sorbitol, previene la senescencia foliar en las plantas *in vitro* de *Dioscorea alata*.

Por otro lado, en la presente investigación se encontró que el uso de diferentes osmorreguladores no promueve la oxidación, tampoco la aparición de tejido celular desorganizado (callo) en el explante (tabla 1).

Tal como lo muestra la tabla 2, la longitud del tallo varía dependiendo de la fuente de carbono utilizada, siendo los tratamientos T<sub>7</sub> y T<sub>8</sub> los que presentan el menor desarrollo, en este sentido se evidencia el efecto de la interacción entre el manitol y sorbitol, la cual provoca una reducción considerable en el desarrollo del explante, dando lugar a plantas "enanas", caracterizadas por poseer tallos y hojas pequeñas, así como nudos muy cerca unos de otros. Este fenómeno es el resultado de la interacción del genotipo de la planta con un azúcar inerte como lo es el manitol en conjunto con un azúcar medianamente metabolizable como lo es el sorbitol. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Borges *et al.*, (2009), quien encontró que el uso de manitol no afecta de forma significativa la longitud del tallo durante la conservación *in vitro* de la especie *Dioscorea alata* clon caraqueño.

**Tabla 2.** Longitud del tallo, número de raíces, longitud de raíz y número de nudos en *Dioscorea alata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

| Trat           | Longitud tallo (cm) | Número raíces | Longitud raíz (cm) | Número nudos |
|----------------|---------------------|---------------|--------------------|--------------|
| T <sub>1</sub> | 2,46 a              | 4,94 bc       | 6,86 a             | 8,24         |
| T <sub>3</sub> | 1,64 a              | 5,47 abc      | 3,89 b             | 7,52         |
| T <sub>4</sub> | 0,94 bc             | 8,63 a        | 3,73 b             | 7,78         |
| T <sub>5</sub> | 1,12 b              | 3,60 c*       | 3,87 b             | 5,78         |
| T <sub>6</sub> | 2,53 a              | 5,23 abc      | 5,06 ab            | 7,63         |
| T <sub>7</sub> | 0,78 c*             | 7,78 ab       | 1,45 c*            | 5,78         |
| T <sub>8</sub> | 0,75 c*             | 8,48 ab       | 1,36 c*            | 6,54         |
| TEST           | Kruskal             | Tukey         | Tukey              | Tukey        |

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para  $p < 0,05$ , Donde (\*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

|   |                              |   |
|---|------------------------------|---|
| T <sub>1</sub> : Sacarosa 3%                | T <sub>3</sub> : Sorbitol 2% | T <sub>4</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 2% |
| T <sub>5</sub> : Sorbitol 1%                | T <sub>6</sub> : Sorbitol 3% | T <sub>7</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 1% |
| T <sub>8</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 3% |                              |   |

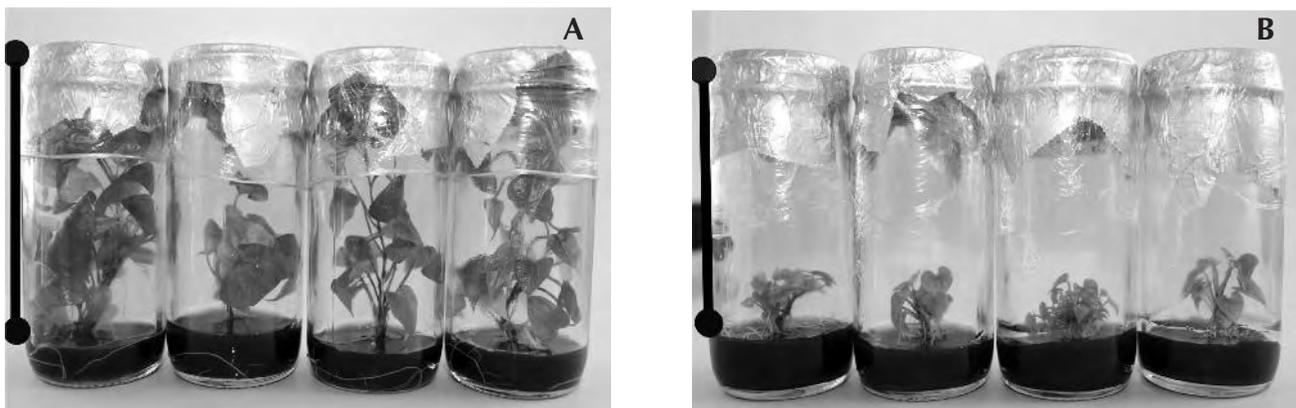
Asimismo, el número de raíces en esta especie varía dependiendo del osmorregulador utilizado, siendo el uso de sorbitol a bajas concentraciones quien provoca el menor desarrollo de esta variable, lo cual es aconsejable para la conservación *in vitro*, ya que permite restringir la absorción de nutrientes por parte del explante. No obstante, al emplear concentraciones de sorbitol por encima del 1%, en forma individual o combinada, se produce un gran número de raíces.

En este sentido, aunque el uso de sorbitol en conjunto con manitol, genera el mayor número de raíces, estas se caracterizan por ser de tamaño pequeño, posiblemente porque la planta necesita aumentar la cantidad de estructuras encargadas de absorber los nutrientes

del medio, para suplir las necesidades de su metabolismo, de esta manera, los explantes en estos tratamientos “prefieren” incrementar el número de raíces aunque su tamaño sea muy reducido.

Por otra parte, los resultados encontrados muestran que el uso de diferentes fuentes de carbono no afecta la formación de nudos en la especie *Dioscorea alata*, a los 8 meses de conservación *in vitro*. Estos resultados coinciden con los encontrados por Borges *et al.*, (2009).

Con base a lo anteriormente expuesto, es posible afirmar que la especie *Dioscorea alata* responde de forma más adecuada al tratamiento T<sub>4</sub>, es decir, que el uso



**Figura 1.** Aspecto de las plantas de *Dioscorea alata* a los 8 meses de conservación *in vitro*. a) plantas en medio de sacarosa 3% (barra= 8,5cm). b) plantas en medio de manitol-sorbitol (1,5-2%) (barra= 8,5cm).

combinado en el medio de cultivo de manitol-sorbitol permite la conservación *in vitro* de esta especie durante 8 meses, ya que este tratamiento posee la mayor tasa de supervivencia y el menor porcentaje de senescencia foliar, además de presentar un desarrollo restringido en el resto de sus variables (figura 1).

**Experimento 2: Efecto del manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea rotundata***

Los resultados encontrados en este ensayo muestran que la tasa de supervivencia en la especie *Dioscorea rotundata* se ve afectada por el uso de diferentes osmorreguladores, siendo los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>7</sub>, quienes presentan los mayores valores y por tanto son considerados adecuados para la conservación *in vitro* de esta especie. Además, se debe tener en cuenta que el uso individual de manitol en el medio de cultivo resulta ser inadecuado, ya que en estas condiciones la tasa de supervivencia es demasiado baja. Estos resultados no coinciden con los reportados por Carmona et al. (2013), quien encontró que la tasa de supervivencia de la especie *Dioscorea rotundata* no se ve afectada por el uso de diferentes reguladores osmóticos, especialmente al emplear manitol. Una posible explicación a este fenómeno puede estar relacionada con el geno-

tipo del material vegetal empleado, ya que pertenecen a cultivares diferentes.

Por otro lado, los resultados obtenidos evidencian que el porcentaje de hojas expandidas y muertas también varía con relación al tipo de fuente de carbono utilizada, en este sentido el uso de la combinación manitol-sorbitol genera valores reducidos de esta variable, evidenciando así un retraso en el crecimiento y desarrollo de los explantes.

Asimismo, la evaluación de la senescencia foliar en las plantas indico que las combinaciones manitol-sorbitol, son adecuadas para la conservación *in vitro*, siempre y cuando no se utilicen altas concentraciones de sorbitol (superiores al 2%), ya que en ambos ensayos la presencia de sorbitol suele estar asociada a altos porcentajes de senescencia foliar. Resultados similares fueron encontrados por Carmona et al. (2013).

Con respecto a los porcentajes de oxidación y callo, se encontraron resultados similares a los presentados por *Dioscorea alata*, es decir, no se evidencio un efecto significativo en la aparición de estas características al emplear diferentes fuentes de carbono.

Los resultados obtenidos muestran que la reducción en el crecimiento del tallo puede lograrse mediante el uso de la combinación manitol-sorbitol, o la apli-

**Tabla 3.** Porcentajes de supervivencia, hojas expandidas, muertas, callo y oxidación en *Dioscorea rotundata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

| Trat           | Supervivencia (%) | Hojas expandidas (%) | Hojas muertas (%) | Callo (%) | Oxidación (%) |
|----------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------|---------------|
| T <sub>1</sub> | 100,00 a*         | 94,95 ab             | 1,39 bc*          | 4,17      | 0,00          |
| T <sub>2</sub> | 33,33 c           | 83,83 abc            | 0,00 c            | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>3</sub> | 100,00 a*         | 93,70 ab             | 1,53 bc*          | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>4</sub> | 100,00 a*         | 75,70 bc             | 1,04 bc*          | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>5</sub> | 86,31 b           | 8,06 a               | 0,40 bc*          | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>6</sub> | 91,67 ab          | 79,50 bc             | 6,14 a            | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>7</sub> | 100,00 a*         | 69,53 c*             | 2,49 ab           | 0,00      | 0,00          |
| T <sub>8</sub> | 95,83 ab          | 72,60 c*             | 0,55 bc*          | 0,00      | 0,00          |
| TEST           | Kruskal           | Kruskal              | Kruskal           | Kruskal   | No aplica     |

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para  $p < 0,05$ , Donde (\*) atributo deseable para la conservación *in vitro*.

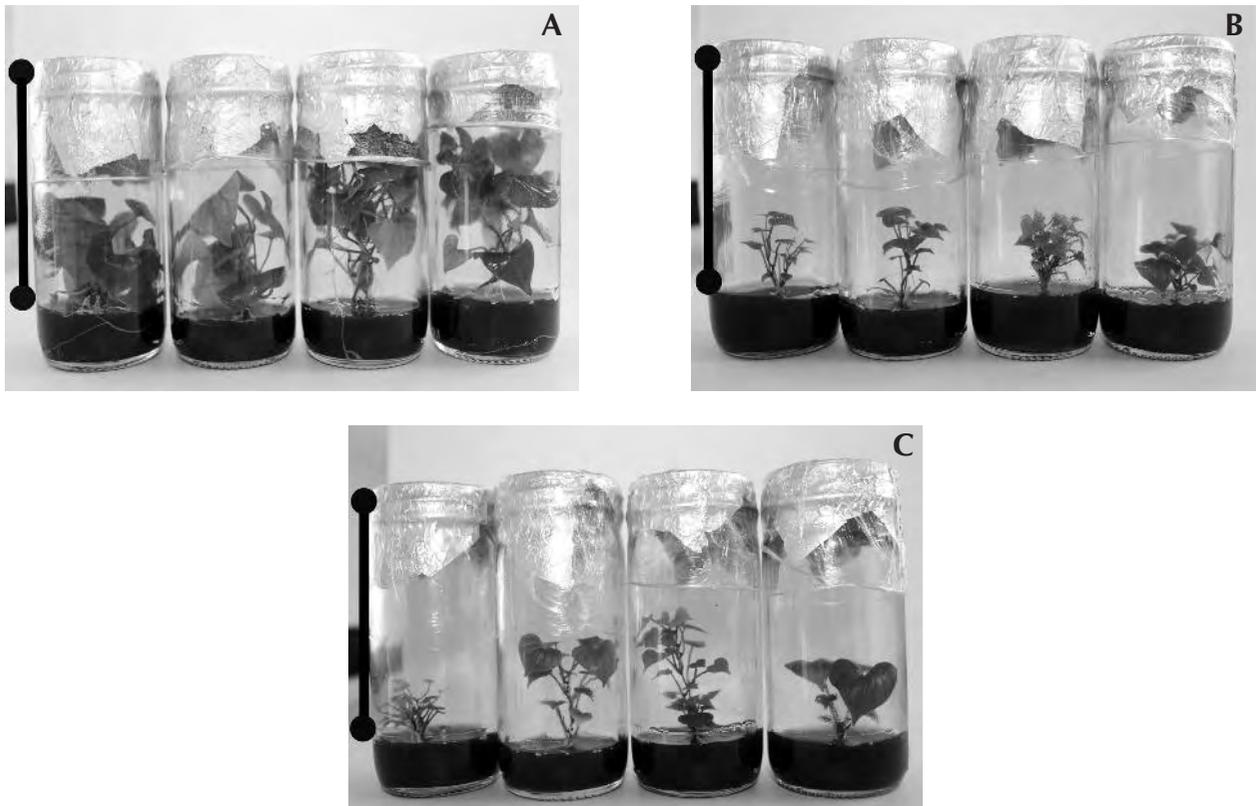
|   |   |                              |
|---|---|------------------------------|
| T <sub>1</sub> : Sacarosa 3%                | T <sub>2</sub> : Manitol 1,5%               | T <sub>3</sub> : Sorbitol 2% |
| T <sub>4</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 2% | T <sub>5</sub> : Sorbitol 1%                | T <sub>6</sub> : Sorbitol 3% |
| T <sub>7</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 1% | T <sub>8</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 3% |                              |

**Tabla 4.** Longitud del tallo, número de raíces, longitud de raíz y número de nudos en *Dioscorea rotundata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

| Trat           | Longitud tallo (cm) | Número raíces | Longitud raíz (cm) | Número nudos |
|----------------|---------------------|---------------|--------------------|--------------|
| T <sub>1</sub> | 2,15 a              | 5,37 a        | 6,40 a             | 5,75         |
| T <sub>3</sub> | 1,17 ab*            | 1,67 bc       | 1,48 c             | 4,51         |
| T <sub>4</sub> | 1,24 ab*            | 1,45 cd*      | 1,39 c             | 5,49         |
| T <sub>5</sub> | 2,17 a              | 2,37 ab       | 2,40 ab            | 5,96         |
| T <sub>6</sub> | 1,84 ab*            | 2,26 ab       | 2,28 b             | 6,36         |
| T <sub>7</sub> | 1,17 ab*            | 1,33 cd*      | 0,70 d*            | 4,65         |
| T <sub>8</sub> | 1,10 ab*            | 1,92 bc       | 1,69 c             | 5,24         |
| TEST           | Tukey               | Kruskal       | Kruskal            | Tukey        |

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para  $p < 0,05$ , Donde (\*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

|   |   |                              |
|---|---|------------------------------|
| T <sub>1</sub> : Sacarosa 3%                | T <sub>2</sub> : Manitol 1,5%               | T <sub>3</sub> : Sorbitol 2% |
| T <sub>4</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 2% | T <sub>5</sub> : Sorbitol 1%                | T <sub>6</sub> : Sorbitol 3% |
| T <sub>7</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 1% | T <sub>8</sub> : Manitol 1,5% + Sorbitol 3% |                              |



**Figura 2.** Aspecto de las plantas de *Dioscorea rotundata* a los 8 meses de conservación *in vitro*. a) plantas en medio de sacarosa 3% (barra= 8,5cm). b) plantas en medio de manitol-sorbitol (1,5-2%) (barra= 8,5cm). c) plantas en medio de manitol-sorbitol (1,5-1%) (barra= 8,5cm).

cación de sorbitol en concentraciones superiores al 1%, asimismo es posible alcanzar una reducción considerable en la formación y elongación de raíces mediante el uso de dicha combinación, por tanto, estas condiciones son aconsejables para la conservación *in vitro* de esta especie, es decir, los tratamientos T<sub>4</sub> y T<sub>7</sub>. Adicionalmente, los resultados indicaron que no existe un efecto significativo en la formación de nudos en la plantas *in vitro* al emplear diferentes osmorreguladores en el medio de cultivo.

Finalmente, al tener en cuenta los planteamientos anteriormente mencionados es posible afirmar que los tratamientos T<sub>7</sub> y T<sub>4</sub>, son los más adecuados para la conservación *in vitro* de la especie *Dioscorea rotundata*, ya que permiten reducir significativamente su crecimiento y desarrollo en cuanto a las variables de longitud de tallo y raíz, así como también en el número de raíces, manteniendo tasas altas de supervivencia y un porcentaje mínimo de senescencia foliar (figura 2).

### Conclusión

Finalmente podemos concluir que el medio compuesto por sales (MS) + manitol 15 g/L + sorbitol 20 g/L + carbón activado 2 g/L + tiamina 1mg/L + mioinositol 0,1g/L + agar 8 g/L permiten de manera efectiva la conservación de plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de *Dioscorea alata* suplementados con 4 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de ANA y *Dioscorea rotundata* suplementado con 0.3 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de ANA, durante 8 meses con altos porcentajes de supervivencia, bajos porcentajes de senescencia foliar, evidenciando un desarrollo restringido en plantas *in vitro*.

### Agradecimientos

Esta investigación fue realizada satisfactoriamente gracias al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre y el apoyo otorgado por el programa de Joven Investigador e Innovador de Colciencias No. 566 del año 2012.

### Referencias bibliográficas

- Acedo, V.Z. y Arradoza, C. (2006). Development of *in vitro* slow growth culture for yam (*Dioscorea alata* L.). PCARRD, 30(1), 1 p.
- Borges, M., Alarcón, Y., Malaurie, B., Hernández, Y. y Silva, J. (2009). Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (*Dioscoreaceae*). *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 203-208.
- Cárdenas, M. y Villegas, A. (2002). Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25(2), 213-217.
- Carmona, O., Díaz, L. y Beltrán, J. (2013). Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. *Revista Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, (25), 1-519.
- De Mendiburu, F. (2012). Manual rápido de uso de la librería agrícola. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60 p.
- Estrada, E., Borges, M., González, L., Hernández Y., Kosky, R. y Malaurie, B. (2009). Aplicación de algunas técnicas de estadística multivariada al estudio de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. *Revista de Biotecnología Vegetal*, 9(3), 153-159.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. Citado por Borges García, M. et al., (2009). Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. 203-208.
- Neiva, C. y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21(1), 193-205.
- Reina, Y. C. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. *Banco de la Republica sucursal Cartagena*. 1(168), 31. ISSN 1692-3715.
- Rodríguez, M., Matehus J., Gerstl A. y Santana M. (2008). Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia*. 33(7), 1-11.
- Ortega, R., Beltrán, J., y Marrugo, J. (2011). Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Cynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. *in vitro*. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 13(1), 33-41. Recuperado de: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22923/38225>.
- Salazar, R. y Beltrán, J. (2002). Microtuberización en Ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(2), 27-32.
- Thurston, D. (1998). Tropical plant diseases. APS-Press. Segunda edición. p 79-82.

# Viabilidad de una bacteria láctica encapsulada e incorporada en una matriz de cobertura de chocolate

## Viability of encapsulated lactic bacteria added in a matrix of chocolate coverage

*Estefania Garcia Gonzalez\**, *Liliana Serna Cock\*\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.44824

### Resumen

Se evaluó la viabilidad durante el almacenamiento de *Weissella confusa* incorporada en una matriz de cobertura de chocolate. La bacteria probiótica se encapsuló empleando tres materiales de pared, gel de Aloe vera, gel Aloe vera + Almidón al 10 % y gel de Aloe vera + Almidón al 15 % y células libres como control. Posteriormente se liofilizó. La bacteria probiótica encapsulada, se incorporó en una matriz de cobertura de chocolate. Los chips se empacaron y almacenaron durante 5 semanas a 4 °C, cada semana se midieron cambios en la viabilidad de la bacteria probiótica y en la actividad de agua. En la quinta semana, los chips se sometieron a condiciones simuladas de jugos intestinales. Durante el almacenamiento los chips mantuvieron su carácter probiótico ( $>10^6$  UFC/g), sin embargo, cuando la bacteria probiótica se encapsuló en gel aloe vera, se obtuvo mayor número de bacterias probióticas vivas dentro de la matriz sólida ( $2,1 \times 10^8$  UFC/g). La actividad de agua varió de 0,470 a 0,810. La bacteria probiótica permaneció viva por 2 horas en medios simulados de jugos intestinales, lo cual ratifica que la matriz sólida y los medios de encapsulación seleccionados son adecuados para el desarrollo de productos sólidos probióticos ricos en grasa vegetal.

**Palabras clave:** probiótico, chip, encapsulación, Aloe, almidón, viabilidad celular.

### Abstract

Viability during storage of *Weissella confusa* incorporated in a chocolate coating matrix was evaluated. Probiotic bacteria was encapsulated using three wall materials, Aloe vera gel, Aloe vera gel + 10 % starch and aloe vera gel + 15 % starch and free cells as control. Subsequently lyophilized. Probiotic bacteria encapsulated, was incorporated into a chocolate coating matrix. The chips were packed and stored for 5 weeks at 4 °C, were measured weekly changes in viability of the probiotic bacteria and water activity. In the fifth week, the chips were subjected to simulated conditions of intestinal juices. During storage chips remained probiotic character ( $>10^6$  CFU/g), however, if the probiotic bacteria are encapsulated in aloe vera gel, the greater number of living probiotic bacteria was obtained within the solid matrix ( $2,1 \times 10^8$  CFU/g). Water activity ranged from 0.470-0,810. Probiotic bacteria remained alive for 2 hours in simulated intestinal fluid media, which confirms that the solid matrix and the selected encapsulation means are suitable for the development of solid product rich in vegetable fat probiotics.

**Key words:** probiotic, chip, encapsulation, Aloe, starch, cellular viability.

**Recibido:** septiembre 16 de 2014

**Aprobado:** abril 20 de 2015

### Introducción

La selección de matrices alimentarias adecuadas para incorporar probióticos, es un factor importante que se debe considerar en el desarrollo de alimentos probióticos (Ranadheera et al., 2010). Se ha reportado que

las mejores matrices para las bacterias probióticas son los productos lácteos fermentados (Rivera y Gallardo, 2010), sin embargo, se ha presentado demanda creciente de productos probióticos no lácteos, por lo cual los probióticos se están incorporando en matrices só-

\* Ingeniera Agroindustrial, Universidad Nacional de Colombia – Palmira (Valle del Cauca, Colombia), Cra 32 No 12 – 00 Vía Candelaria, egarciagon@unal.edu.co

\*\* PhD Ing. Alimentos, Universidad Nacional de Colombia – Palmira (Valle del Cauca, Colombia), Cra 32 No 12 – 00 Vía Candelaria, lserna@unal.edu.co

lidas y líquidas, y están siendo comercializados como suplementos en forma de pellets, cápsulas y liofilizados (Ranadheera et al., 2010; Rivera y Gallardo, 2010).

En el diseño de éstos nuevos productos probióticos se deben tener en cuenta además, la viabilidad del microorganismo dentro de la matriz alimentaria y su actividad funcional (Jankovic et al., 2010; Da Silva, 2011). La inclusión de microorganismos probióticos en una matriz de alimento seco tendría muchas ventajas en comparación a matrices líquidas (Ouwehand et al., 2004). Sin embargo, para que la matriz sólida probiótica tenga efectos benéficos en la salud humana, es necesario asegurar que las bacterias se mantengan vivas durante el almacenamiento del producto, y que una vez consumido el producto, los microorganismos probióticos resistan el paso por el sistema gastrointestinal (Burgain et al., 2011).

Una alternativa para incrementar la eficacia de los probióticos es incorporarlos en matrices alimentarias que proporcionen protección (Possemiers et al., 2010); se han mostrado desarrollos en la incorporación de probióticos en matrices basadas en chocolates como mousse, torta y barras de chocolate (Aragon et al., 2007; Malmo et al., 2011; Possemiers et al., 2010), mostrando que el chocolate es un buen vehículo para la incorporación de probióticos, debido a su contenido en lípidos y carbohidratos. Uno de los sucedáneos del chocolate es la cobertura de chocolate y una de sus formas más comunes es el chip, que se emplea en la elaboración de galletas, helados y tortas frías, por lo que resulta innovador vehiculizar a los probióticos en esta matriz.

*Weissella confusa* es una bacteria ácido láctica, que en la actualidad se le considera con potencial probiótico ya que presenta actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos patógenos (Nam et al., 2002; Serna et al., 2010; Ayeni et al., 2011; Lee et al., 2012). De igual manera, se ha encontrado que el aloe vera es un material de pared promisorio para encapsular ésta bacteria láctica (Serna et al., 2012). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar durante el almacenamiento, cambios en la viabilidad del microorganismo probiótico, y cambios en la actividad de agua de chip probióticos elaborados con cobertura de chocolate y con la bacteria ácido láctica *Weissella confusa*, encapsulada en diferentes materiales de pared. Además, determinar la resistencia del microorganismo probiótico bajo condiciones simuladas de jugos intestinales.

## **Materiales y métodos**

### ***Bacteria probiótica***

Se utilizó una cepa crioconservada de la bacteria ácido láctica *Weissella confusa*, la cual se aisló en estudios previos de Serna et al. (2010). Para obtener la cantidad

necesaria de bacterias se realizaron fermentaciones en discontinuo, utilizando como sustrato de fermentación caldo MRS (Scharlau España) (De Man et al., 1960), al cual se le adicionó 40 gL<sup>-1</sup> de glucosa como fuente de carbono. El sustrato se inoculó con el 10 % de caldo previamente inoculado con respecto al volumen del sustrato. Se realizaron 4 fermentaciones en erlenmeyer de 1000 ml, los cuales permanecieron agitados elipsoidalmente a 100 rpm, por 6 horas, a 37 °C (equipo Incubating Orbital Shaker model 5000I, USA). Transcurrido el tiempo de fermentación se separaron las bacterias, centrifugando el fermentado a 4480 x g (Eppendorf AG, Alemania). El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 5 ml de NaCl al 0,9 % y se centrifugó por 5 min a 4480 x g. El precipitado se lavó nuevamente con 10 ml de agua destilada estéril, se centrifugó por 5 min a 4480 x g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las bacterias probióticas se encapsularon.

### ***Encapsulación de las bacterias probióticas***

Se utilizó gel de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) y almidón comercial (Industrias del maíz AMISOL 2143, Colombia) a dos concentraciones 10 y 15 % como materiales de encapsulación (mejores resultados de encapsulación no documentados). El gel de aloe vera se sometió a tratamiento térmico a 65 °C durante 15 min en un baño termostático (Julabo 13A, Alemania), y se almacenó en refrigeración a 4 °C. El almidón al 10% y al 15% se utilizó combinado con aloe vera en proporción de 1:1. Las bacterias probióticas obtenidas por fermentación, en concentración de 10<sup>11</sup> UFC/g, se mezclaron en relación 1:4 con los materiales de encapsulación. A las bacterias encapsuladas en aloe vera se les designó tratamiento AV, encapsuladas en aloe vera+almidón al 10% (AA10%) y encapsuladas en aloe vera+almidón al 15 % (AA15 %). Posteriormente las bacterias encapsuladas se liofilizaron (Eyela FDU 1100, Japón) (congelación a -20 °C, presión de vacío de 2 Pa y temperatura en el condensador de -60 °C, temperatura de secado 25 °C). Como tratamiento control se utilizó la bacterias probiótica (*W. confusa*) no encapsulada, diluida en agua destilada estéril (CL). El control CL se liofilizó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

### ***Preparación y almacenamiento de chip de cobertura de chocolate probiótico***

Se empleó cobertura de chocolate negro (Nacional de Chocolates, Colombia) con un contenido de grasa de 37 g/100g. La cobertura de chocolate se fundió a 48 °C y se atemperó a 30°C. Posteriormente, a la cobertura de chocolate fundida se le adicionó, por separado, los tratamientos AV, AA10, AA15 y CL, se homogenizaron manualmente. La mezcla se vertió en moldes de PET (calibre 15) para chip de 6 mm de diámetro, los chips se solidificaron a una temperatura de

4 °C, se desmoldaron y se empacaron en bolsas de poliamida, laminada con polietileno de baja densidad, con permeabilidad de 4,4 - 4,9 g/m<sup>2</sup>/h/atm. Los chips probióticos se almacenaron en refrigeración a 4 °C. La temperatura de 4°C se seleccionó ya que los chips son ampliamente utilizados para la fabricación de tortas refrigeradas, postres, helados, entre otros.

### **Determinación de la viabilidad de las bacterias probióticas**

La viabilidad de las bacterias probióticas se midió inmediatamente después del proceso de liofilización, y cada semana chips durante el almacenamiento (5 semanas).

Para determinar el número de bacterias vivas en cada tratamiento, en frascos de dilución se tomó 1 g de chips de cada tratamiento (o 1 g del tratamiento control) y 9 ml de agua peptona al 0,1 % previamente atemperado a 48 °C, se agitaron durante 1 minuto en vortex (Reidolph Reax control, Alemania), con el fin de liberar las bacterias de su material de encapsulación. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales empleando agua peptona al 0,1 %, las muestras se sembraron a profundidad en agar MRS, el conteo se realizó después de 48 h de incubación a 37 °C. Se contaron las cajas que contenían entre 30 y 300 colonias y el recuento de células vivas se expresó en UFC g<sup>-1</sup>.

La viabilidad de los microorganismos probióticos se determinó con la ecuación 1:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{N}{N_0} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde, para la encapsulación: N<sub>0</sub> es el número de bacterias vivas por gramo antes del proceso de encapsulación, y N: es el número de bacterias vivas por gramo después de la encapsulación.

Para la liofilización, N<sub>0</sub> es el número de bacterias vivas por gramo después de la encapsulación, y N: es el número de bacterias vivas por gramo después de la liofilización.

Para el almacenamiento: N<sub>0</sub> es el recuento de bacterias vivas en el momento de la elaboración de los chips probióticos y N: es el número de bacterias vivas por gramo en cada semana de almacenamiento.

### **Actividad de agua (a<sub>w</sub>)**

Durante el almacenamiento se midió la actividad de agua de los chips probióticos, empleando un medidor de actividad de agua (Agualab Model Serie 3 TE, USA) a temperatura de 25 °C.

### **Resistencia de la bacteria probiótica a jugos intestinales simulados**

La mayor composición en nutrientes de los chips de chocolate es la grasa vegetal. El proceso de absorción

de grasas, se realiza principalmente en el intestino delgado, donde intervienen la bilis y las lipasas pancreáticas, ambos compuestos con pH alcalino (Cueto y Aragón, 2012), por lo cual, después de 5 semanas de almacenamiento, los diferentes tratamientos se sometieron a medios simulados de jugos intestinales empleando la metodología modificada de Malmo et al., 2011. Los jugos intestinales (JI) se prepararon con sales biliares al 4,5% (p/v) (Sharlau, Barcelona, España) y se ajustaron a pH 8,0 con NaOH 0,1 mol/L estéril. La solución se esterilizó por filtración utilizando una membrana de 0,22 µm. Los chips probióticos se macearon, y 0,5g de chips se agregaron a 45 ml de la solución JI, se llevaron a agitación elipsoidal (80 rpm) en un shaker (Incubating Orbital Shaker, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) por 2 horas a 37 °C. La viabilidad de la bacteria probiótica se midió en el momento de mezclar los chips con JI y a las 2 horas. La viabilidad se midió de la misma forma descrita arriba.

### **Diseño experimental**

Para evaluar durante el almacenamiento de los chips probióticos, el efecto de los materiales de encapsulación sobre la viabilidad del probiótico, y la aw del producto, se utilizó un diseño unifactorial con medidas repetidas en el tiempo. Como factor se utilizó material de encapsulación de la bacteria probiótica con tres niveles (AV, AA10 % y AA15 %). Las variables de respuesta fueron la actividad de agua y el porcentaje de viabilidad del probiótico. Las variables de respuesta se midieron en 6 tiempos (0, 1, 2, 3, 4 y 5 semanas de almacenamiento). Se realizó una prueba de Tukey para diferencias entre medias con un nivel de significancia del p-valor < 0.05 y los datos se analizaron a través del software SAS versión 9.3. Adicionalmente se midió la viabilidad del probiótico después de la liofilización, en los tres tratamientos AV, AA10 % y AA15 % y después de que cada tratamiento se sometió dos horas a jugos intestinales.

## **Resultados y discusión**

### **Viabilidad de la bacteria probiótica después de la liofilización en los tratamientos AV, AA10% y AA15%**

El tratamiento AV presentó el mayor porcentaje de bacterias probióticas vivas, después del proceso de liofilización (tabla 1). Estos resultados coinciden con los reportados por Abadias et al. (2001), quienes evaluaron la viabilidad de *Candida sake*, al recubrirla con diferentes materiales protectores durante la liofilización, obteniendo viabilidades del 0,2 % cuando empleó una concentración de glucosa y fructosa al 1 % y una viabilidad del 1 % cuando se empleó una solución de galactosa al 1 %.

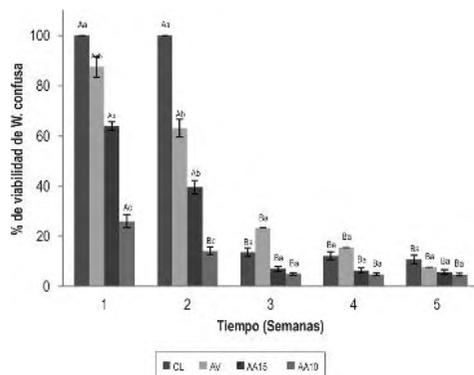
Una explicación a la disminución drástica de la viabilidad durante la liofilización se le puede atribuir a la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación, los cuales causan daño en la membrana celular de las bacterias (Homayouni *et al.*, 2008), se suman a ésta, la baja solubilidad del almidón y la posible nucleación y separación de fases (cristalización) de los azúcares del aloe vera (Pehkonen *et al.*, 2007), ya que la cristalización del azúcar desactiva la interacción entre el azúcar y las estructuras celulares, interacción que se cree provee una protección adicional a las células (Crowe *et al.*, 1998 citado por Foerst *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Porcentaje de viabilidad del probiótico (*W. confusa*) después del proceso de liofilización, y recuento inicial del probiótico una vez se ha incorporado al chocolate.

| Tratamiento | % Viabilidad  | Células en chocolate (UFC/g)               |
|-------------|---------------|--|
| CL          | 0,084 ± 0,010 | 2,8x10 <sup>9</sup> ± 4,24x10 <sup>7</sup> |
| AV          | 1,184 ± 0,110 | 4,2x10 <sup>8</sup> ± 1,41x10 <sup>6</sup> |
| AA10        | 0,183 ± 0,065 | 2,8x10 <sup>7</sup> ± 4,24x10 <sup>5</sup> |
| AA15        | 0,005 ± 0,001 | 1,0x10 <sup>6</sup> ± 4,24x10 <sup>4</sup> |

#### Viabilidad de la bacteria probiótica en chips de cobertura de chocolate durante el almacenamiento

En la primera semana de almacenamiento se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre tratamientos (figura 1). El tratamiento CL presentó la mayor viabilidad, seguido por los tratamientos AV, AA15 y AA10.

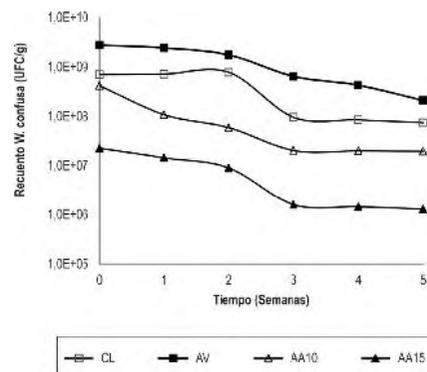


**Figura 1.** Porcentaje de viabilidad de *Weissella confusa* en chips de chocolate, almacenados durante 5 semanas.

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) para un mismo tratamiento durante el tiempo evaluado. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre diferentes tratamientos una misma semana.

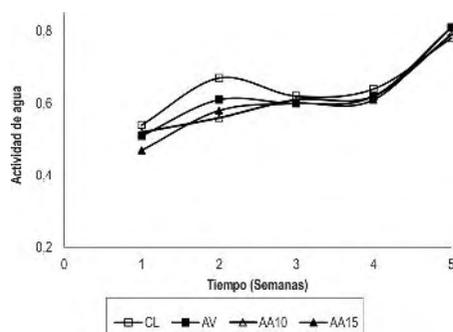
El comportamiento de CL a la primera y segunda semanas de almacenamiento indica que la cobertura de chocolate es una matriz alimentaria que por sí sola provee protección inicial a las células (Nebesny *et al.*, 2007; Aragon *et al.*, 2007). Sin embargo a la tercera semana de almacenamiento, el tratamiento CL, presentó un descenso drástico en la viabilidad. Este comportamiento se podría explicar porque la grasa presente en la cobertura de chocolate (37 g/100 g) proporciona protección a la bacteria probiótica, evitando que las células sean expuestas al agua (presente en la cobertura de chocolate y en el espacio de cabeza del empaque) y evitando factores de estrés como el que producen los iones H<sup>+</sup> (Lahtinen *et al.*, 2007), sin embargo es posible que al transcurrir el tiempo de almacenamiento las capas de grasa de la matriz formen grietas por donde el agua puede migrar directamente (Weinbreck *et al.*, 2010). Otras causas atribuibles al descenso en la viabilidad del probiótico pueden ser las reacciones de deterioro de la cobertura de chocolate como la oxidación de los fitoesteroles, lo cual puede generar varios tipos de hidroxí, epoxi, ceto y derivados de triol (Botelho *et al.*, 2014), los cuales tienen actividad antimicrobiana (Brudzynski, 2006). Además, los sucedáneos del chocolate, como la cobertura de chocolate contienen polifenoles, que provienen del cacao y ejercen efectos antimicrobianos (Possemiers *et al.*, 2010), con la consecuente pérdida de viabilidad.

En la figura 2 se presenta el recuento de células durante 5 semanas de almacenamiento. Para todos los tratamientos la concentración final de células estuvo en el rango donde se considera al alimento como probiótico ( $10^6 - 10^7$  UFC/g) (Krasaekoopt *et al.*, 2003), concentraciones recomendadas para el consumo de alimentos probióticos (FAO/WHO, 2001). Los productos que contienen probióticos, deben almacenarse en refrigeración para mantener una alta viabilidad. El periodo de expiración para estos productos, ya sea jugo o barra, es más corto que en productos sin probióticos (Christopher *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Recuento de *W. confusa* en los diferentes tratamientos evaluados durante 5 semanas de almacenamiento a 4°C.

Los chips se empacaron en un empaque con permeabilidad alta a vapor de agua (4,4 - 4,9 g/m<sup>2</sup>/h/atm), por lo cual presentaron aumento sustancial de la a<sub>w</sub> durante las 5 semanas de almacenamiento (figura 3), en un promedio de 0,6 a 0,8. Esto se puede explicar por un fenómeno que le ocurre al chocolate llamado cristalización (llamado también "Bloom"), donde se libera agua y la actividad de agua podría aumentar (Vercet, 2003), este aumento en la actividad de agua podría tener incidencia en la textura del chip. Katz y Labuza (1981) muestran que un incremento en la actividad de agua de 0.4 a 0.45, podría inducir a una pérdida de dureza en alimentos con bajo contenido de humedad, además de proliferación de hongos y levaduras, que influyen en el deterioro del alimento (Beuchat, 2002).



**Figura 3.** Actividad de agua de chips de cobertura de chocolate durante el almacenamiento a 4°C en un empaque de poliamida con permeabilidad de 4,4 - 4,9 g/m<sup>2</sup>/h/atm.

Uno de los criterios importantes para la selección de un probiótico es su capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés causado por bajo o alto pH (Cook *et al.*, 2012); este es el caso del tracto gastrointestinal. En la tabla 2, se presentan el número de microorganismos probióticos que lograron sobrevivir en los chips de chocolate, después de 5 semanas de almacenamiento y después de estar sometidos a 2 horas en un sistema simulado de jugos intestinales (pH 8,0). Todos los tratamientos presentaron tolerancia a las sales biliares, presentando reducciones, iguales o menores, de una unidad logarítmica. Este mismo comportamiento se presentó en los resultados de Lee *et al.* (2012) quienes mostraron reducción de 1 unidad logarítmica (5,6x10<sup>10</sup> a 7,2x10<sup>9</sup> UFC/g) al evaluar el mismo microorganismo (*W. confusa*) en las mismas condiciones del presente estudio. La concentración empleada en este estudio (0,3 % de sales biliares) se considera que es una concentración crítica utilizada para la selección de cepas resistentes (Gilliland *et al.*, 1984). Se conoce que las grasas son moléculas hidrofóbicas que necesitan la acción de sales biliares para su absorción, ya que las sales biliares presentan una región hidrofóbica que interactúa con los glóbulos de grasa, y una región hidrofílica que se orienta hacia el medio acuoso, permitiendo la acción de enzimas como las lipasas pancreáticas que

hidrolizan la grasa en ácidos grasos y monoglicéridos para su posterior absorción en el intestino delgado, de esta manera permitir la disminución del colesterol sérico (Manzano *et al.*, 2012). Tanto las sales biliares como las lipasas son de pH alcalino, por lo cual con los resultados se puede afirmar que tanto la matriz de chocolate como el probiótico *W. confusa*, son aptos para el diseño de productos probióticos en fase sólida ya que resisten el almacenamiento, y permanecen vivos al paso por el intestino delgado. La resistencia al paso de sales biliares es uno de los criterios para que un producto se considere probiótico.

**Tabla 2.** Recuento de *W. confusa* en chips de cobertura de chocolate sometidos a sistema simulado de jugos intestinales.

| Tiempo    | Tratamiento (UFC/g)  |                      |                      |                      |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|           | CL                   | AV                   | AA10                 | AA15                 |
| t=0 min   | 7,45x10 <sup>7</sup> | 2,10x10 <sup>8</sup> | 1,96x10 <sup>7</sup> | 1,30x10 <sup>6</sup> |
| t=120 min | 8,15x10 <sup>6</sup> | 1,34x10 <sup>8</sup> | 4,90x10 <sup>6</sup> | 1,28x10 <sup>6</sup> |

## Conclusiones

La cobertura de chocolate y la bacteria ácido láctica *W. confusa*, son idóneos para el desarrollo de productos probióticos en matrices sólidas. Los chips de cobertura de chocolate mantienen su condición de probióticos por lo menos durante 5 semanas ya que permanecieron vivos más de 10<sup>6</sup> microorganismos por gramo de producto. La actividad de agua aumento para todos los tratamientos, lo que sugiere, emplear un empaque con menor transmisión de vapor de agua y almacenar a condiciones de humedad relativa baja. La incorporación de *W. confusa* encapsulada y libre a una matriz de cobertura de chocolate presenta resistencia al medio intestinal, siendo los tratamientos AV y AA15 los que presentan menor pérdida de viabilidad.

## Agradecimientos

Se agradece al programa "Jóvenes investigadores e innovadores 2012" de COLCIENCIAS.

## Referencias bibliográficas

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., y Vinas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the bio-control yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 173-182.
- Aragon-Alegro, L.C., Alarcon Alegre, J.H., Cardarelli, R.H., Chih Chiu, M. y Isay Saad, S.M. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 669-675.
- Ayeni, F.A., Sánchez, B., Adeniyi, B.A., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. y Ruas-Madiedo, P. (2011). Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's

- intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 97–104.
- Beuchat, L.R. (2002). Water activity and microbial stability. Fundamentals of water activity. IFT Continuing Education Committee. Anaheim, CA. 14-15.
- Botelho, P.B., Galasso, M., Dias, V., Mandrioli, M., Lobato, L.P., Rodriguez-Estrada y M.T., Castro, I.A. (2014). Oxidative stability of functional phytoesterol-enriched dark chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 444–451.
- Brinques, G.B., y Ayub, M.A.Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123–128.
- Brudzynski, K. (2007). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities materials and methods of Canadian Honeys". *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1228–1237.
- Burgain, J, Gaiani, C., Linder, M. y Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(24), 467–483.
- Christopher M, Reddy V. y Venkateswarlu K. (2009). Viability during storage of two *Bifidobacterium bifidum* strains in set and stirred flavoured yoghurts containing whey protein concentrates. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(1), 25-31.
- Cueto, C., y Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*, 3(1), 45–50.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., y Khutoryanskiy, V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 162(1), 56–67.
- Da Silva S. M. (2011). Incorporation of probiotics in cereal bars: Technological viability and stability. [MSc. Tesis social Communication]. Braga (Portugal): Universidade Católica Portuguesa. Escola Superior de Biotecnología. 4 p.
- De Man J.C., Rogosa M. y Sharpe, M. E. A. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
- FAO/WHO. Food and agriculture organization/ World Health Organization. (2001). Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. p, 1–34. Recuperado de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>.
- Forst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S., y Santivarangkna, C. (2012). Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 295–300.
- Gilliland, S.E, Staley, T.E y Bush, I.J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67(12), 3045-3051. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81670-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7).
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S., y Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55.
- Jankovic, I.; Sybesma, W.; Phothirath, P.; Ananta, E., y Mercenier, A. 2010. Application of probiotics in food products – Challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.
- Katz, E.E. y Labuza T.P. (1981). Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *Journal Food Science*, 46(2), 403–409. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb04871.x.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Lahtinen, S.J., Ouwehand, C., Salminen, S.J., Forsell, P., y Myllärinen, P. (2007). Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5), 500–505.
- Lee, K.W., Park, J.Y., Jeong, H.R., Heo, H.J., Han, N.S., y Kim, J.H. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, 18(1), 96 – 102.
- Malmo, C., Storia, A., y Mauriello, G. (2011). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Cells Coated in Alginate Beads with Chitosan by Spray Drying to Use as a Probiotic Cell in a Chocolate Soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 795–805.
- Manzano C., Estupiñan D.G. y Poveda E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: Que dice la evidencia científica. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1), 98–110.
- Nam, H., Ha, M., Bae, O. y Lee, Y. (2002). Effect of *Weissella confusa* Strain PL9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4642-4645.
- Nebesny, E., Źyżelewicz, D., Motyl, I., y Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, 225(1), 33–42.
- Ouwehand, A.C., Kurvinen, T., y Rissanen, P. (2004). Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an in vivo study. *International journal of food microbiology*, 95(1), 103–106.
- Pehkonen, K.S., Roos, Y.H., Miao, S., Ross, R.P., y Stanton, C. (2008). State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *Journal Applied Microbiology*, 104(6), 1732–1743.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W. y Van De Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 97–103.
- Ranadheera, R. D. C. S.; Baines, S.K., Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Rivera-Espinoza, Y. y Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1-11.
- Serna L., Valencia, L.J. y Campos, R. (2010). Cinética de fermentación y acción probiótica de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*, 55, 53-63.
- Serna-Cock, L., Vallejo-Castillo, V.E. y García-Gonzalez, E. (2012). Gel de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) en la encapsulación de una bacteria ácido láctica. *Vitae*, 19(1), S168-S170.
- Vercet, A. 2003. Browning of white chocolate during storage. *Food Chemistry*, 81(3), 371–377.
- Weinbreck, F., Bodnár, I. y Marco M.L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 364–367.

# Caracterización molecular con microsatélites amplificados al azar (RAMs) de Inchi (*Caryodendron orinocense* K.)

## Molecular characterization with random amplified microsatellites (RAMs) of Inchi (*Caryodendron orinocense* K.)

*Ana Cruz Morillo-Coronado*<sup>\*</sup>, *Liseth Gómez-Beltrán*<sup>\*\*</sup>, *Iván A. Ávila-Morales*<sup>\*\*\*</sup>,  
*Ernesto Andrade*<sup>\*\*\*\*</sup>, *Yacenia Morillo-Coronado*<sup>\*\*\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50709

### Resumen

El Inchi o Cacay (*Caryodendron orinocense* Karsten) es una de las especies más promisorias de la Amazonía y la Orinoquia colombiana. El principal producto del Cacay son sus almendras, de las que se extrae un aceite con aplicaciones cosméticas, fitoterapéuticas y alimenticias, además presenta un alto contenido de antioxidantes como los Omega 3, 6 y 9 y Vitaminas como la A y E. No existen estudios sobre la caracterización molecular de este recurso fitogenético, por lo cual el objetivo de esta investigación fue caracterizar la diversidad genética usando marcadores Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). El análisis de similitud al 0.50 formó cuatro grupos de acuerdo al sitio geográfico, siendo los materiales procedentes de Putumayo, Cacayal 19, Pauna y Castilla los de menor similitud. Los valores de heterocigosidad estimada fueron de 0.16 y 0.28 para los cebadores CGA y GT, respectivamente. El porcentaje de loci polimórfico varió entre 55% para el cebador CGA y el 90% para el GT. El valor de *Fst* promedio para los 27 materiales estudiados fue de 0.35, mostrando que la dinámica espacio-temporal de los materiales de *Caryodendron* tienden hacia una diferenciación genética, propio de sus procesos evolutivos e incidencia de la domesticación.

**Palabras clave:** cacay, marcadores moleculares, diversidad genética, flujo genético, domesticación.

### Abstract

The Inchi or Cacay (*Caryodendron orinocense* Karsten) is one of the most promising species of the Amazon and Orinoco Colombian. The main product of Cacay are its almonds, from extracted oil cosmetic, phytotherapeutic and food applications, also has a high content of antioxidants such as Omega 3, 6 and 9 and vitamins like A and E. There are no studies on the molecular characterization of this plant genetic resource; therefore the objective of this research was to characterize the genetic diversity using Random Amplified Microsatellite markers (RAMs). The similarity analysis to 0.50 formed four groups according to geographical location, being materials from Putumayo, Cacayal 19, Pauna and Castilla lowest similarity. Estimated heterozygosity values were 0.16 and 0.28 for the primers CGA and GT, respectively. The percentage of polymorphic loci ranged from 55% for the primer CGA and 90% for the GT. The average *Fst* value for the 27 materials studied was 0.35, showing the space-temporal dynamics of materials *Caryodendron* tend toward genetic differentiation, due to their own evolutionary processes and domestication incidence.

**Key words:** cacay, molecular markers, genetic diversity, genetic flow, domestication.

**Recibido:** septiembre 15 de 2014

**Aprobado:** abril 10 de 2015

<sup>\*</sup> PhD, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) Tunja. Colombia.  
Autor para correspondencia: ana.morillo@uptc.edu.co.

<sup>\*\*</sup> I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. Email: ladgb1228@gmail.com.

<sup>\*\*\*</sup> I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. Email: ivanavilamorales@hotmail.com.

<sup>\*\*\*\*</sup> I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. Email: eandrade@unillanos.edu.co.

<sup>\*\*\*\*\*</sup> PhD, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. E-mail: ymorillo@unillanos.edu.co.

## Introducción

El Inchi (*Caryodendron orinocense* K.), pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, de la cual hacen parte alrededor de 60 géneros y cerca de 529 especies, siendo una de las familias más grandes y diversas dentro de las plantas con flores (USDA, 2014). Es conocido en diferentes partes del mundo como Metohuayo (Perú); inchi, cacay, tacay (Colombia); cacay, ñambi, maní de árbol (Ecuador); palo de nuez, nuez de Barquisimeto (Venezuela), Castanha do porco (Brasil). Es una especie originaria de la Amazonía occidental, y se encuentra ampliamente distribuida en la cuenca amazónica en Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Martínez, 1996). El cacay es un árbol que alcanza entre 15 y 20 m de altura, es una especie rústica, de gran adaptabilidad a suelos ácidos con altos contenidos de aluminio, además se considera una de las especies más promisorias de la región Amazónica y la Orinoquia colombiana (Jaramillo y Jaramillo, 2010).

La producción promedio de árbol adulto es de 250 Kg/año, lo que representa un ingreso familiar de \$200.000/año (Díaz y Ávila, 2002). El Inchi además del uso que tiene su tronco como madera, el cuesco como combustible y la nuez en alimento, su utilización más importante es la producción de aceite a partir de la semilla, convirtiéndose en una excelente planta oleaginosa, compitiendo muy ventajosamente con otras como la palma africana el cual es usado tanto para consumo (Omega 3, 6 y 9) como para la elaboración de cosméticos y productos farmacéuticos (Barrio, 2005; Jiménez y Bernal, 2002). El gran potencial del inchi está dado no sólo por la calidad de su aceite sino por la torta, producto restante de la extracción de las semillas, la cual puede utilizarse en la alimentación animal, ya que contiene alto porcentaje de proteína (43-46%) y minerales como el calcio y el fósforo (Tamayo, 1963).

En cacay, existen pocos estudios acerca de su caracterización morfoagronómica, sólo se reporta los realizados por el Sinchi por Ávila y Cárdenas (2000), quienes evaluaron el germoplasma de cinco especies amazónicas; igualmente se encuentran algunos estudios preliminares realizados por Corpoica aún no publicados. Teniendo en cuenta que el conocimiento de la diversidad genética es necesario para la conservación y el mejoramiento genético de la especie, no se tienen estudios de caracterización genética o molecular ni siquiera en especies a fines como *Caryodendron amazonicum* Ducke, *Caryodendron angustifolium* Stanley y *Caryodendron grandifolium*. Dentro de la familia *Euphorbiaceae* encontramos a el piñón (*Jatropha curcas* L.) y Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) como especies productoras también de aceites de alta calidad, y en las cuales se han desarrollado investigaciones encaminadas a la identificación genética de los materiales (Basha et al., 2007; Ganesh et al., 2008; Basha et al., 2009; Jubera et al., 2009; Pamidimarri et al., 2009 a y

b; Subramanyam et al., 2009; Cai et al., 2010; Ikbal et al., 2010; Vargas 2011; Corazon et al., 2009; Rodríguez et al., 2010).

Los marcadores moleculares conocidos como los RAMs también conocidos como ISSR (Intersimple Sequence Repeat) son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, diferencia entre familias, entre especies y al interior de la especie (Muñoz et al., 2008), muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no lo hace (Mahuku et al., 2002; Morillo, 2005). Esta metodología es factible para pequeños laboratorios en términos de equipos y facilidades de costo, no requiere el conocimiento previo de secuencias, no requiere el uso de isótopos radioactivos. Los marcadores obtenidos por los RAMs se pueden usar para estudios de poblaciones (Hantula et al., 1997).

El objetivo de este trabajo de investigación fue caracterizar la diversidad genética de Cacay (*Caryodendron orinocense* K.) usando marcadores Microsatélites RAMs para en un futuro poder proponer estrategias de conservación y mejoramiento genético de la especie.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de 29 árboles entre machos y hembras de Inchi (*Caryodendron orinocense* K.) procedentes del departamento del Meta, en los municipios de San Juan de Arama, Lejanías, Cubarral, Guamal, El Castillo, Restrepo y algunos materiales fueron proporcionados por el vivero KAHAI S.A.S (tabla 1). Se incluyó una mayor cantidad de plantas con órganos sexuales femeninos o hermafroditas que aseguren una alta producción de frutos, así como también de buenas características agronómicas y de adaptabilidad.

En la figura 1 se observa la distribución espacial de los árboles de *Caryodendron orinocense* que se utilizaron en este estudio.

### Caracterización molecular

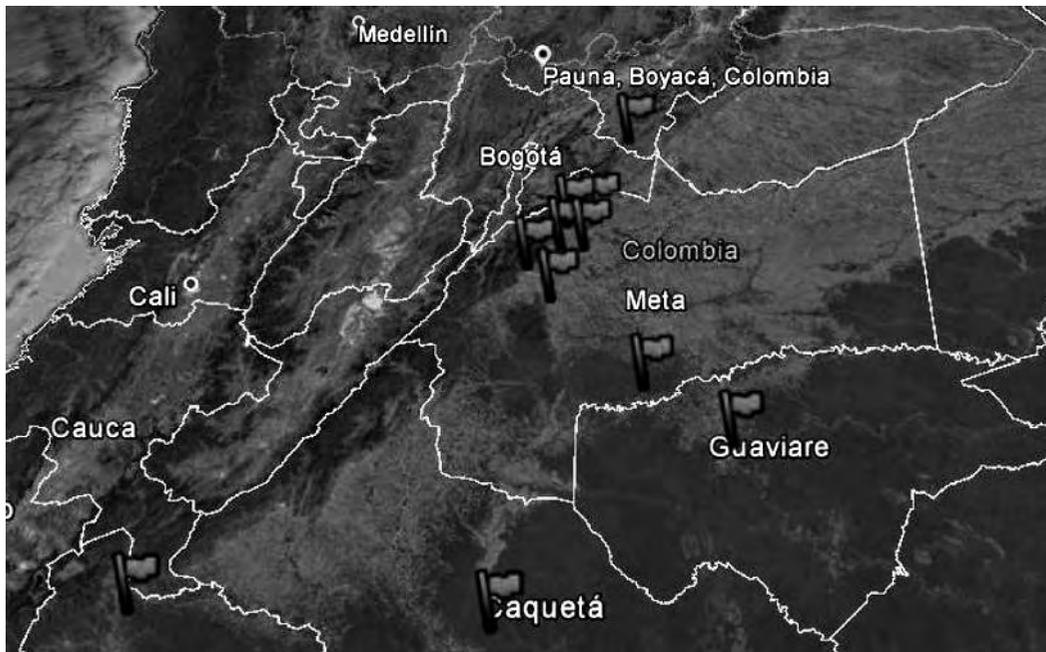
La caracterización molecular de Inchi se llevó a cabo en los laboratorios de biotecnología vegetal y reproducción y genética animal de la Universidad de los Llanos, localizada en Villavicencio, Meta, Colombia; a una altura de 467 msnm y temperatura promedio de 26°C. Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta (1983).

El ADN genómico de las muestras totales se visualizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electrofo-

**Tabla 1.** Acciones de *Caryodendron orinocense* utilizadas para la caracterización molecular con microsatélites RAMs.

| Nº de Entrada | Colecta                       | Departamento          | Ubicación Georeferenciada        | Descripción                                  |
|---------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--|
| 1             | San Juan de Arama /Alto Curia | Meta                  | 03°23´95"N 73°57´434"O           | Árbol nativo hembra (17 años)                |
| 2             | San Juan de Arama /Alto Curia | Meta                  | 03°23´95"N 73°57´434"O           | Árbol nativo macho (17 años)                 |
| 3             | Lejanías/Cacayal              | Meta                  | 03°28´458"N 73°54´209"O          | Árbol hembra (20-30 años)                    |
| 4             | Lejanías/Cacayal              | Meta                  | 03°28´458"N 73°54´209"O          | Árbol Macho (20-30 años)                     |
| 5             | Lejanías/Buenos Aires         | Meta                  | 03°27´93"N 73°54´396"O           | Árbol Macho (63 años)                        |
| 6             | Lejanías/Buenos Aires         | Meta                  | 03°27´93"N 73°54´396"O           | Árbol Hembra (63 años)                       |
| 7             | Cubarral/Km 1vía al Dorado    | Meta                  | 03°47´56"N 73°50´795"O           | Tres hembras altamente productivas (40 años) |
| 8             | Guamal/La Paz                 | Meta                  | 03°49´886"N 73°45´267"O          | Una hembra (aprox. 30 años)                  |
| 9             | Guamal /Pío XII               | Meta                  | 03°49´886"N 73°45´267"O          | Un macho (20 años)                           |
| 10            | Guamal /Pío XII               | Meta                  | 03°53´59"N 73°47´309"O           | Una hembra (aprox. 70 años)                  |
| 11            | Castillo/Santa Cruz           | Meta                  | 03°33´459"N 73°45´637"O          | Una hembra (aprox. 15 años)                  |
| 12            | Acacias/Santa Teresita        | Meta                  | 03°59´130"N 73°42´458"O          | Una hembra (aprox.30 años)                   |
| 13            | Montelibano/Acacias           | Meta                  | 03°59´253"N 73°48´486"O          | Selección Árboles Hembra*                    |
| 14            | Lejanías/Cacayal              | Meta                  | 03°28´454"N 73°54´208"O          | Selección Árboles Hembra*                    |
| 16            | Morelia                       | Caquetá               | 01°26´43.66"N 75°41´153"O        | Selección Árboles Hembra*                    |
| 17            | Mocoa                         | Putumayo              | 01°5´6.37"N 076°39´24.35"O       | Selección Árboles Hembra*                    |
| 18            | Castilla la Nueva/Betania     | Meta                  | 03°52.967"N 073°42´358"O         | Selección Árboles Hembra*                    |
| 19            | Lejanías/Cacayal              | Meta                  | 03°28´486" 073°84´202"O          | Selección Árboles Hembra*                    |
| 20            | Santa Teresita/Acacias        | Meta                  | 03°59´130"N 73°42´458"O          | Selección Árboles Hembra*                    |
| 21            | Castillo/Santa Cruz           | Meta                  | 03°33´459"N 073°45´637"O         | Selección Árboles Hembra*                    |
| 22            | Pelayo Topo Grande/Pauna      | Boyacá                | 05°39´15.81"N 074°1´17.60"O      | Selección Árboles*                           |
| 23            | Puerto Rico                   | Meta                  | 02°58´9.48"N 073°11´48.79"O      | Selección Árboles Hembra*                    |
| 24            | San José del Guaviare         | San José del Guaviare | 02°34´1.10"N 072°38´32.31"O      | Selección Árboles Hembra*                    |
| 25            | Hermafrodita                  | Meta                  | 4.05788904164,<br>-73.4670889746 | Corpoica La Libertad                         |
| 26            | Hembra Corpoica I             | Meta                  | 4.05788904164,<br>-73.4670889746 | Corpoica La Libertad                         |
| 27            | Hembra Corpoica II            | Meta                  | 4.05788904164,<br>-73.4670889746 | Corpoica La Libertad                         |
| 28            | Hembra Unillanos              | Meta                  | 4°4´30"N 73°35´7"O               | Universidad de los Llanos                    |
| 29            | Hembra Unillanos II           | Meta                  | 4°4´30"N 73°35´7"O               | Universidad de los Llanos                    |

\*KAHAI SAS



**Figura 1.** Posicionamiento geográfico de 29 genotipos de Inchi utilizados para la caracterización molecular.

resis Gel System. Para determinar la concentración de ADN de cada genotipo se hizo una curva de dilución con ADN del bacteriófago Lambda de concentración inicial 20 ng/μl y se llevó a concentraciones finales de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/μl. El ADN cuantificado se diluyó en agua tipo HPLC a un volumen total de 100 μl a 10 ng/μl y se almacenó a -20 °C.

Para el análisis RAMs se utilizaron siete cebadores sintetizados por Technologies Inc. (tabla 2). Para la reacción de amplificación con RAMs se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrífuga (1.5 ml) para un volumen final de 25 μl. La mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 μM y ADN genómico 10ng.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la técnica microsátelites RAMs.

| Cebador | Secuencia (5´ a 3´) |
|---------|---------------------|
| CCA     | DDB(CCA)5           |
| CGA     | DHB(CGA)5           |
| GT      | VHV(GT)5G           |
| AG      | HBH(AG)7A           |
| CT      | DYD(CT)7C           |
| TG      | HVH(TG)7T           |
| CA      | DBDA(CA)7           |

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ. Research, Inc). La desnaturalización inicial fue a 95°C durante 5 min; desnaturalización a 95 °C por 30 seg, hibridación a una temperatura de 50 °C (cebadores AG y CA), 55 °C (cebadores CCA-TG-CT) y 58 °C (cebadores GT-CGA) durante 45 seg, una extensión final de 72 °C por 2 min, 37 ciclos desde la desnaturalización a extensión y por último una extensión a 72 °C durante 7 min. Los productos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % corridos a 90 voltios durante 3 h visualizándose en un transiluminador de luz ultravioleta.

### Análisis estadístico

Se generó una matriz binaria de ausencia (cero) y presencia (uno). La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979). El análisis cluster se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma utilizando el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC). Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad insesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses, versión 1.3, 1997). Se determinó el f estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95 %.

### Resultados y discusión

De los 29 genotipos de Inchi colectados, dos fueron descartados ya que no se pudo obtener ADN. Los sie-

te cebadores RAMs utilizados para la caracterización molecular de 27 genotipos generaron un total de 85 bandas las cuales contribuyeron en un 90% a la discriminación de los materiales. El número de bandas por iniciador varió de 10 para el cebador CA y 20 para el cebador CGA, con pesos moleculares oscilaron entre 260 y 1500 Kb (tabla 3).

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la caracterización molecular de *Caryodendron orinocense* K, número de bandas totales y polimórficas.

| Cebador | No. de bandas totales | No. de bandas polimórficas |
|---------|-----------------------|----------------------------|
| CGA     | 20                    | 11                         |
| TG      | 13                    | 8                          |
| GT      | 18                    | 16                         |
| CCA     | 13                    | 8                          |
| CT      | 11                    | 9                          |
| CA      | 10                    | 9                          |

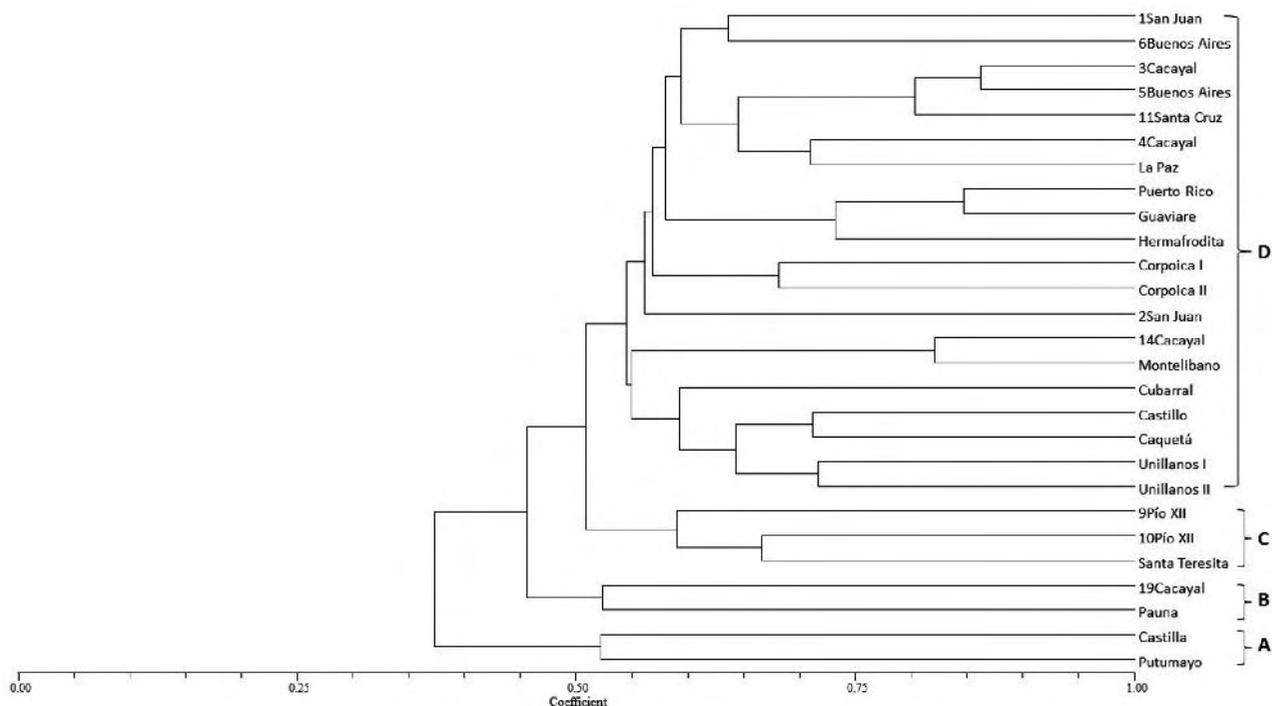
Cuando se compara el número de loci polimórficos (62) encontrados en este estudio con otros trabajos

sobre diversidad genética en especies de la familia *Euphorbiaceae*, como los realizados por Vargas (2011) (73 bandas polimórficas), Basha y Sujatha (2007) (116 bandas polimórficas) y Souza *et al.*, 2009 (27 polimórficas) en *Jatropha curcas* L, el número de bandas encontrado luce adecuado para la estimación de los parámetros genéticos en Inchi. El cebador GT fue el que mayor aporte hizo a la variación genética observada, lo que significa que puede ser útil para evaluar la diversidad genética en materiales de *Caryodendron*.

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li, a un nivel de similaridad de 0.50, dividió la población en 4 grupos (A, B, C, D) (figura 2).

Los grupos A y B que incluyen los materiales de Putumayo, Castilla, Pauna y Cacayal 19 son los que presentan el menor valor de similaridad (0.50) con respecto de los demás grupos formados, esto se puede evidenciar en las características propias de estos materiales tales como tamaño del fruto, color del fruto, tamaño de la hoja, tamaño y color de la nuez según observaciones realizadas por la empresa KAHAI S.A.S

Como puede observarse el grupo D reúne el mayor número de los materiales que fueron colectados en el departamento del Meta junto con los materiales de Guaviare y Caquetá, y presenta un índice de similaridad superior a 0.70, lo que permite evidenciar una



**Figura 2.** Dendrograma de la estructura genética de 27 individuos de *Caryodendron orinocense* K, basado en el Coeficiente de Similaridad de Nei-Li, y calculado de los datos combinados de los siete cebadores Microsatélites RAMs, con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SAHN y TREE de NTSYS-pc Versión 1.8.

baja variabilidad genética entre los individuos, la cual puede deberse al flujo genético, al transporte de material vegetal y al origen uniparental (FAO, 2002). Los materiales de Pío XII identificados con los números 9 y 10, y Santa Teresita que conformaron el grupo C presentan características similares en cuanto a su composición genética y morfológica, esto puede explicarse por su cercanía geográfica, ya que Guamal y Acacias son municipios con una distancia menor a los 20 km.

En términos generales, el análisis molecular agrupó a los materiales de *Caryodendron orinocense* de acuerdo a su distribución geográfica, evidenciando que los materiales procedentes de Putumayo y Boyacá (Pauna) presentan menos similitud genética con el resto de los materiales evaluados, en tanto que los materiales de Guaviare y Caquetá se agruparon con los materiales del departamento del Meta. Esto puede explicarse al transporte de material vegetal entre estos dos departamentos y la polinización cruzada (flujo génico) entre plantas de un mismo origen geográfico.

Los valores de heterocigosidad estimada estuvieron en un rango comprendido entre 0.16 y 0.28 para los cebadores CGA y CT, respectivamente. El porcentaje de loci polimórfico varió entre 55% para el cebador CGA y el 90% para el CT (tabla 4).

**Tabla 4.** Heterocigosidad estimada y porcentaje de loci polimórficos de cada uno de los cebadores utilizados para la caracterización de la diversidad genética en *Caryodendron orinocense*.

| Cebador                | Nº Loci | He Estimado | % Loci Polimórficos (95%) |
|------------------------|---------|-------------|---------------------------|
| CGA                    | 20      | 0.16        | 55.00                     |
| CCA                    | 13      | 0.22        | 61.54                     |
| CT                     | 11      | 0.28        | 90.00                     |
| CA                     | 10      | 0.26        | 81.82                     |
| TG                     | 13      | 0.22        | 69.23                     |
| GT                     | 18      | 0.24        | 88.89                     |
| <b>Población Total</b> | 85      | 0.2259      | 72.94                     |

Estudios realizados por Vargas (2011) en la identificación de la diversidad genética en *Jatropha* usando diez marcadores ISSR encontró un porcentaje de polimorfismo promedio de 34%, el cual es similar al observado en otros trabajos en *Jatropha* como los realizados por Basha y Sujetha (2007) quienes evaluaron 42 accesiones con marcadores RAPD e ISSR encontrando un 42% de polimorfismo y una moderada diversidad genética; Reddy et al. (2007) utilizando RAPD

y AFLPs en 23 materiales obtuvieron un 15 y 9% de polimorfismo respectivamente, concluyendo que la diversidad genética es baja coincidiendo con las investigaciones realizadas por Sun et al. (2008). Sin embargo; otros estudios muestran la existencia de moderada a alta diversidad genética en *Jatropha* con porcentajes de polimorfismos que van desde 35 al 98% (Ganesh et al., 2008; Gupta et al., 2008; Pamidimarri et al., 2009a; Senthil Kumar et al., 2009; Basha et al., 2009; Singh et al., 2010; Tatikonda et al., 2009; Cai et al., 2010). Estudios realizados por Corazon-Guivin (2009), en la caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del banco nacional de germoplasma de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L), muestran un porcentaje de loci polimórficos de 60.87%, por lo que los resultados de esta investigación se encuentran dentro de los resultados obtenidos en los estudios realizados en la familia de las *Euphorbiaceae*.

El valor de *Fst* promedio para los 27 materiales estudiados fue de 0.35, con una desviación estándar de 0.07, según Wright (1978) valores por encima de 0.25 muestran diferenciación genética. El *Fst* encontrado en este estudio es un parámetro importante puesto que ayuda a entender la dinámica espacio-temporal de los materiales de *Caryodendron*, así como la estructura de cruzamientos entre ellos. Para efectos comparativos, Nason (2002) plantea que en concordancia con la alta tasa de exogamia y la dispersión de polen a largas distancias que parecen caracterizar las poblaciones de árboles neotropicales, dichas poblaciones presentan una diversidad relativamente alta y un grado de diferenciación genética relativamente bajo, aún en poblaciones que se encuentran a kilómetros de distancia.

Sin embargo; en la especie estudiada a pesar de ser alógama, presenta un alto grado de polinización entre individuos emparentados lo que resulta en una diversidad genética baja y un índice de diferenciación genética (*Fst*) alto. En el género *Plukenetia* (*Euphorbiaceae*) Rodríguez et al., (2010) realizó estudios de diferenciación morfológica y molecular usando marcadores ISSR, encontrando valores de *Fst* entre 0.89 y 0.98, con lo cual se evidenció un alto grado de diferenciación entre las accesiones estudiadas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que para estudiar la genética de poblaciones y su grado de estructuración, es indispensable tener poblaciones estructuradas y con un suficiente número de individuos y realizar evaluaciones en el tiempo que permitan sacar conclusiones del flujo genético y la dinámica poblacional.

El mayor grado de polimorfismo e información genética aportados por la técnica RAMs puede ser complementado con información proveniente de la caracterización morfológica y bioquímica, y así poder elucidar en una forma más clara las intrincadas relaciones e interacciones que se presentan en la mayoría de los materiales y evaluar la diversidad intraespecífica de ellos en una escala mucho más fina.

## Conclusiones

Los marcadores RAMs permitieron determinar la variación genética existente en los materiales de *Caryodendron orinocense* evaluados agrupándolos de acuerdo al sitio geográfico donde fueron colectados.

Se determinó que existe poca variabilidad genética debido a los procesos de reproducción uniparental, sin embargo estos materiales presentan diferenciación genética dado por los procesos de domesticación y evolución a la que están sometidos los materiales constantemente.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de Kahai S.A.S, Centro de Investigación Corpoica La Libertad, Laboratorio de biotecnología vegetal y reproducción y genética animal y a la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de los Llanos. Este trabajo de investigación fue seleccionado en la "Convocatoria para apoyar financieramente la ejecución de Proyectos de Investigación de grado año 2012", por la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de los Llanos.

## Referencias bibliográficas

Ávila, G., y Cárdenas, J. (2000). Clasificación y caracterización morfoagronómica del germoplasma de cinco especies frutales amazónicas. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. SINCHI. Santafé de Bogotá. 28p.

Barrios, H. (2005). *Sacha. La gran revolución de las grasas* (The Big Fat Revolution), 28, Norma (ed). Recuperado de <http://la gran tierra.com>.

Basha, S. D., Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K., y Sujatha, M. (2009). A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science*, 176(6), 812-823.

Basha, S. D., y Sujatha, M. (2007). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*, 156(3), 375-386.

Cai, Y., Sun, D., Wu, D., y Peng, J. (2010). ISSR-based genetic diversity of *Jatropha* germplasm in China. *Biomass and Bioenergy*, 34(12), 1739-1750.

Corazon, M., Castro, D., Chota, W., Rodríguez, A., Cachique, D., Manco, E., Del-Castillo, D., Renno, J., y García, C. (2009). Caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del Banco Nacional de germoplasma de Sacha Inchi *Plukenetia volubilis* L. (E.E. El Porvenir-INIA). *Folia Amazónica*, 18(1-2), 23-31.

Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Mol Biol Rep*, 1(4), 19-21.

Díaz, J. A., y Ávila, L. M. (2002). *Sondeo del mercado mundial de Inchi (Caryodendron orinocense)*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 16 pp.

FAO, (2002). Estudio FAO, Montes 44/3. *Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos*. Ejemplos de América Latina. 245 pp.

Ram, S. G., Parthiban, K. T., Kumar, R. S., Thiruvengadam, V., & Paramathma, M. (2008). Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 803-809.

Gupta, S., Srivastava, M., Mishra, G. P., Naik, P. K., Chauhan, R. S., Tiwari, S. K., ... & Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 7(23), 4230-4243.

Hantula, J., Dusabenyagasani, M., y Hamelin, R. (1997). Random Amplified Microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26(3), 159-166.

Ikbali, K., y Dhillon, R. (2010). Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. *Indian Jour. Biotech*, 9(1), 50-57.

Jaramillo, A., y Jaramillo, C. (Junio de 2010). *El Inchi una alternativa económica para Colombia*. En: Memorias del VII Seminario Internacional de Frutas Tropicales. Agroindustria e Innovación, Medellín, Colombia. 64p.

Jiménez, C.; H. Bernal. (2002). El inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten). La oleaginosa más promisoría de la subregión andina. 2 ed. SECAB. Ministerio de Educación y Ciencia. España. Corporación Andina de Fomento. 429pp.

Jubera, M., Janagoudar, B., Biradar, D., Ravikumar, R., Koti, R., y Patil, S. (2009). Genetic diversity analysis of elite *Jatropha curcas* L. genotypes using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22(2), 293-295.

Martínez, S.J.B. (1996). El Inchi *Caryodendron orinocense* Karst. Oleaginosa nativa de América Tropical. Departamento de Fitotecnia, Facultad de Agronomía Universidad de Nariño. Pasto. Colombia. 52 p.

Mahuku, G.S., Henríquez, M. A., Muñoz, J.E., y Buruchara, R.A. (2002). Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytop*, 96(6), 580-589.

Morillo, A., Morillo, Y., Zamorano, A., Vásquez, H., y Muñoz, J. E. (2005). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios (RAMs) de la colección de mora *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. *Acta Agron*, 54(2), 15-24.

Muñoz, J. E., Morillo, C. A., y Morillo, C. Y. (2008). Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agron*, 57(4), 219-226.

Nei, M., y Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci*, 79(10), 5267-5273.

Nason, J. (2002). La estructura genética de árboles. En: Ecología en Conservación de bosques Neotropicales. Guariguata, M.R y G.H, Catan, Editores. Libro universitario regional (EULAC-GTZ), Costa Rica, 631p.

Pamidimarri, D.V.N.S., Sinha, R., Kothari, P., y Reddy, M. P. (2009a). Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 431-433.

Pamidimarri, D.V.N.S., Mastan, S.G., Rahman, H., y Reddy, M.P. (2009b). Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. *Mol. Biol. Repor*, 37(5), 2249-2257.

Reddy, M.P., Chikara, J., Patolia, J., y Ghosh, A. (2007). Genetic improvement of *J. curcas* adaptability and oil yield. In: *Fact Seminar on J. curcas* L., *Agronomy and Genetics*, 26-28 March 2007, Wageningen, The Netherlands, Published by FACT Foundation.

Rodríguez, A., Corazon-Guivin, M., Cachique, D., Mejía, K., Del Castillo, D., Renno, J.F., y García-Dávila, C. (2010). Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonia peruana: propuesta de una nueva especie. *Rev. Peru Biol*, 17(3), 325-330.

Senthil, K.R., Parthiban, K.T., y Govinda, R. (2009). Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol.Biol.Rep*, 36(7), 1951-1956.

Singh, P., Singh, S., Mishra, S.P., y Bhatia, S.K. (2010). Molecular Characterization of Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. *Genes. Genomes. Genomics*, 4(1), 1-8.

- Souza, D., Moreira, G.; Guimarães, J.; Librelon, S., Fernandes, T.; Nietsche, S., y Costa, M. (2009). Análise da diversidade genética intrapopulacional de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) com marcadores ISSR. Unimontes, BR.p 7. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras E Biodiesel, 6. Montes Claros. Biodiesel: inovação tecnológica-anais. Lavras: UFLA, 2009.
- Subramanyam, K., Muralidhararao, D., y Devanna, N. (2009). Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD analysis. *African Journ. Biotech*, 8(9), 1900-1910.
- Sun, Q., Lib, L., Lib, Y., Wua, G., y Ge, X. (2008). SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop. Scien*, 48(5): 1865-1871.
- Tamayo, F. (1963). *Plantas comestibles poco conocidas como tales*. *Rev. Fac. Agron.* (Maracay), 3(1), 5-10.
- Tatikonda, L., Wani, S., Kannan, S., Beerelli, N., Thakur, K.S., Hoisington, D., Prathibha, D., y Varshney, R. (2009). AFLP-based molecular characterization of an elite germoplasm collection of *Jatropha curcas* L, a biofuel plant. *Plant. Scien*, 176(4), 505-513.
- USDA. (2014). *Classification for Kingdom Plantae Down to Family Euphorbiaceae*. Recuperado de <http://plants.usda.gov/java/Classification>.
- Vargas, P.R. (2011). Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñon (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter-microsatélites). (Tesis de pregrado). *Escuela Agrícola Panamericana, Honduras*. 26 p.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations, Vol. 4. Editor University of Chicago, press. IL, USA. 590 pp.

# Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor* spp

## Evaluation of experimental production of milk-clotting enzymes using *Rhizomucor* spp strains

Osmar T. Morillo Piña\*, Pablo J. García Lugo\*\*, Balmore Ruizdael Guerrero Cardena\*\*\*, Yzoletth Torres Vielma\*\*\*\*, Rafael F. Castañeda Ruiz\*\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50701

### Resumen

La producción experimental de enzimas coagulante de leche se llevó a cabo en un medio de cultivo de laboratorio durante 190 h de incubación, utilizando tres cepas certificadas de *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei* y dos especies nativas de *Rhizomucor* spp. BIOMI-12 y 13. La evaluación se realizó midiendo la concentración de glucosa y proteína durante la incubación, estimación de la productividad, actividad específica, índice fuerza de cuajo/actividad proteolítica en los extractos enzimáticos crudos, determinación de los pesos moleculares y actividad proteolítica en los extractos enzimáticos parcialmente purificado. Todas las cepas mostraron un consumo de glucosa similar, el mismo comportamiento se observó en el contenido de proteína, excepto la cepa BIOMI-13. Los incrementos en el contenido de proteínas después del descenso, coincidieron con la máxima actividad coagulante registrada por cada cepa, siendo el extracto crudo de la cepa BIOMI-13 la de mayor actividad coagulante (148,15 FC), productividad (3,09 FC/h), índice fuerza de cuajo/actividad proteolítica (142,60 FC/U) y actividad específica (1.062,00 FC/mg). Los extractos enzimáticos parcialmente purificados de las cepas *R miehei* 37, *Rhizomucor* spp BIOMI-12 y 13, presentaron proteínas con pesos moleculares en aproximadamente 22,6 y 46,52 KDa, mientras el extracto *R pusillus* 39 presentó una banda adicional de 39,6 KDa. En el zimograma se observó para todas las cepas actividad proteolítica en las bandas comprendidas entre 40-50 KDa y 20-22 KDa, no así para el *R pusillus* 36, donde fue escasa. Finalmente se determinó que la cepa BIOMI-13, tiene la mayor capacidad para producir enzimas coagulantes de la leche.

**Palabras clave:** renina microbiana, fuerza de cuajo, actividad proteolítica, productividad.

### Abstract

Experimental production of milk clotting enzymes was conducted on a laboratory culture medium for 190 h incubation, using three certified strains of *Rhizomucor pusillus*, *miehei* and two native *Rhizomucor* spp. BIOMI-12 and 13. The evaluation was performed by measuring the concentration of glucose and protein during incubation, estimate productivity, specific activity, rennet strength/proteolytic activity index in the crude enzyme extracts, determining the molecular weights and proteolytic activity in the partially purified enzyme extracts. All strains showed consumption rates of glucose, the same behavior observed protein content, except strain BIOMI-13. The increase in protein content after descent coincided with the recorded maximum coagulant activity each strains, being the crude extract of strain BIOMI-13 higher coagulant activity (148,15 FC), productivity (3.09 HR / h), rennet strength/proteolytic activity index (142,60 FC/U) and specific activity (1,062 FC/mg). The partially purified enzyme extracts from strains *R miehei* 37, *Rhizomucor* spp BIOMI-12 and 13, presented proteins with molecular weights in approximately 22,6 kDa and 46.52, while the extract *R pusillus* 39 present an additional band of 39,6 KDa. In the zymogram was observed for all strains, proteolytic activity in the bands between 40-50 KDa and

\* Ingeniero Químico, cPhD en Biotecnología de Microorganismo. Correo de correspondencia: osmothom@yahoo.com

\*\* PhD Ciencias Biológicas, pgarcial@ula.ve y pgarcial2008@gmail.com

\*\*\* Lic. en Biología, MSc Biotecnología de Microorganismo, balmoregc@gmail.com.

\*\*\*\* Lic. en Biología, yzoletth@hotmail.com.

Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Dpto. Biología. Lab. "Sixto David Rojo", Biotecnología de Microorganismo. La hechicera. CP 5101. Apartado de correos No 37. Telfs. 2401309 - 1283.

\*\*\*\*\* PhD ciencias agrícolas, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Calle 1 Esq. 2, Santiago de Las Vegas, C. Habana, Cuba, C.P. 17200. rfcastaneda@inifat.co.cu

20-22 KDa, but not for the *R pusillus* 36, where activity was very dim. Finally it was determined that the strain BIOMI-13, has the greatest capacity to produce milk clotting enzymes.

**Key words:** microbial rennet, rennet strength, proteolytic activity, productivity.

**Recibido:** mayo 14 de 2014

**Aprobado:** abril 21 de 2015

## Introducción

Las enzimas coagulantes de la leche, juegan un papel fundamental en la producción de quesos, conocidas con el nombre de cuajo, o renina, nombre derivado del vocablo anglosajón rennet, se obtiene como una mezcla de quimosina y pepsina provenientes del tejido del obomaso de ternero, donde la quimosina está presente en mayor proporción de 88-94% dependiendo de la edad del animal. Las quimosina es una enzima proteolítica (EC3.4.23.4), que cataliza la hidrólisis específica de la  $\kappa$ -caseína de la leche en los enlaces Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup>. Está clasificada como una proteasa del ácido aspártico o aspartoproteasa EC 3.4.23., pertenecen al grupo de enzimas endopeptidasas (Ruiz, 2005). Debido a la escasez, altos precios, problemas asociados con la matanza de animales y a la capacidad de producción para satisfacer la industria quesera, ha sido necesaria la búsqueda de otras alternativas para la sustitución de la renina de ternero (Merheb-Dini, Gomes, Boscolo & Da Silva, 2010). Un adecuado sustituto debe tener una intensa actividad coagulante de la leche, es decir, alta capacidad de atacar el enlace peptídico 105-106 de  $\kappa$ -caseína y una baja actividad proteolítica para minimizar la disolución de los coágulos, permitiendo así altos rendimientos en quesería y productos con características sensoriales de alta aceptación.

Las investigaciones están orientadas a la búsqueda de proteasas de origen microbianos, animal o fuentes vegetales (Merheb-Dini et al., 2010). Sin embargo, las proteasas animales y vegetales han demostrado ser fuentes de enzimas de acción inespecíficas en la coagulación de la leche, produciendo quesos con sabores amargos y texturas no deseadas. Por lo tanto, la atención se ha centrado en las fuentes microbianas, debido a su especificidad y las ventajas de su producción, tales como períodos cortos de crecimiento de los microorganismos (Cheng, Bai, & Wang, 2008; Khademi Abachi, Mortazavi, Ehsani, Tabatabaei & Malekzadeh, 2013), suministro ilimitado, bajos costos de producción y permite diseñar nuevos sistemas enzimáticos que no son posibles de obtener a partir de fuentes vegetales o animales. En la actualidad las enzimas coagulantes de la leche de origen fúngica son utilizadas en más de un tercio en la industria lechera en todo el mundo (Khademi, Abachi & Malekzadeh, 2013), producidas experimental e industrialmente por especies como *Thermomucor indicae-seudaticae* (Merheb-Dini et al., 2010), *Bacillus subtilis natto* (Shieh, Phan Thi &

Shihb, 2009), *Mucor circinelloides* (Sathya, Pradeep, Angayarkanni & Palaniswamy, 2009), *Rhizomucor nainitalensis* (Khademi et al., 2013), *Mucor mucedo* DSM 809 (Yegin, Fernández-Lahore, Guvenc & Goksungur, 2010), *Rhizomucor pusillus* y *Rhizomucor miehei* (Maheshwari, Bharadawaj & Mahalingeshwara, 2000; Jacob, Jaros & Rohm, 2011; Foda, Moharam, Ramadan & El-Bendary, 2012). Siendo la proteasa aspártica producida por *R. miehei* la más usada comercialmente (Jacob et al., 2011). Bajo esta premisa se presenta el siguiente trabajo cuyo objetivo principal fue la evaluación y comparación de la capacidad productiva de enzimas con actividad coagulante de cinco cepas de hongos del género *Rhizomucor*.

## Materiales y métodos

### Microorganismos

Se utilizaron cepas de *Rhizomucor pusillus* CVCM-3036 (RP-36), *Rhizomucor miehei* CVCM-3037 (RM-37) y *Rhizomucor pusillus* CVCM-3039 (RP-39) provenientes de la Colección Venezolana de Cultivo de Microorganismos y dos cepas de *Rhizomucor spp*, identificadas como BIOMI-12 (Rsp-12) y BIOMI-13 (Rsp-13) proveniente de la colección de cultivo del laboratorio de Biotecnología de Microorganismo de la ULA.

### Suspensión de esporas

Para cada cepa a evaluar se obtuvieron suspensiones de esporas utilizando el método modificado de Osorio, Gómez, & Sánchez (2008). A micelios esporulados crecidos en erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio Agar Papa Dextrosa, incubados durante 96 h a 37 °C, se adicionaron 30 ml de agua destilada estéril con 25 perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se agitaron manualmente. Una vez recuperada la suspensión, la concentración de esporas se determinó mediante recuento en Cámara Neubauer.

### Producción de enzimas con actividad coagulante de la leche

En experiencias cuádruples las diferentes cepas de hongos fueron crecidas en Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 150 ml del medio de cultivo, formulado con caseína (4 g/l), glucosa (20 g/l), extracto de malta (4 g/l), peptona bacteriológica (4 g/l) y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g/l), se inocularon con 8x10<sup>6</sup> esporas de cada cepa e in-

cubados a 37 °C a 150 rpm durante 190 h. Se tomaron muestras de 4 ml cada 24 h se centrifugaron y filtraron en papel de filtro de celulosa de 11 µm de porosidad, al sobrenadante obtenido se le determinó actividad coagulante de la leche, concentración de proteína y glucosa.

### **Técnicas analíticas**

El consumo de glucosa se cuantificó por el método de DNS para azúcares reductores (Miller, 1959). La tasa de consumo de glucosa se estimó por regresión lineal de los datos.

La variación del contenido de proteína durante el cultivo se determinó por el método de Bradford (Bollag & Edelstein, 1991) usando como estándar albumina bovina.

La actividad coagulante de la leche, se midió por el método de Osorio *et al.* (2008). Consistió en tomar el tiempo que tarda en coagular una muestra de 5,0 ml de leche descremada (al 10 % en 0,01 M de cloruro de calcio) al adicionarle 0,5 ml de sobrenadante del cultivo proveniente de la fermentación. Esta determinación se logró haciendo rotar de manera manual las muestras en un baño maría a una temperatura de 37 °C. La lectura del tiempo de coagulación se hace justo cuando el aspecto de la película de leche sobre la pared interna del tubo de ensayo cambia de fluido laminar a viscoso formándose pequeños grumos. La actividad enzimática se expresó como la fuerza de cuajo (FC) definida como la cantidad de leche cuajada en mililitros por gramo o mililitro de sobrenadante del cultivo en 40 minutos a 37 °C y se calcula mediante la siguiente relación:  $FC = \frac{V * 2400}{C * t}$  (1)

Dónde: FC: fuerza de cuajo, V: cantidad de leche (ml), C: cantidad de sobrenadante del cultivo (ml), t: tiempo de coagulación de la muestra (s), 2.400: tiempo en que normalmente cuaja la leche a 37 °C con un cuajo estándar (s).

La actividad proteolítica se determinó utilizando el método modificado de Anson. Cuantificando los péptidos solubles que resultan de la acción proteolítica de la enzima o de un extracto enzimático sobre la caseína bovina. A 4 ml de solución de caseína bovina al 1%, se agregó 1 ml de extracto enzimático proveniente del medio de cultivo, la mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 20 minutos la reacción se detuvo agregando 4 ml ácido tricloroacético al 10 %. Se filtró y se midió la absorbancia a 280 nm. Definiendo la unidad de actividad proteolítica (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 mg de caseína por minuto. Se utilizó el coeficiente extinción molar de 0,81 ml mg<sup>-1</sup>. (Panouille, Nicolai, Benyahia & Durand, 2005)

### **Capacidad productiva y especificidad de las enzimas coagulantes**

La capacidad productiva se evaluó a través de la siguiente relación:

$$Productividad = \frac{FC_{max}}{t_{FCmax}} \quad (2)$$

Dónde: FC<sub>max</sub>: máxima fuerza de cuajo alcanzada; t<sub>FCmax</sub>: tiempo en que se alcanza la máxima fuerza de cuajo.

Se determinó la actividad específica (FC<sub>max</sub>/mg de proteína) como medida de especificidad de los extractos enzimáticos crudos, y el índice actividad coagulante/actividad proteolítica (FC<sub>max</sub> /U) dividiendo la mayor actividad coagulante registrada por la actividad proteolítica sobre caseína registrada en ese mismo tiempo. La comparación entre las cepas en productividad, índice de actividad coagulante/actividad proteolítica (FC/U) y la actividad específica, se realizó por análisis de varianza de un solo factor para un nivel de significancia del 5% y una comparación de medias a través de la prueba de Tukey. Para ello se estimó la media y la desviación estándar a partir de tres réplicas.

### **Concentración de los extractos crudos y Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE- SDS)**

Los extractos crudos que presentaron la mayor fuerza de cuajo fueron saturados con 15% de sulfato de amonio, luego se dejó en reposo durante 2 horas en baño de agua-hielo y se centrifugaron a 2900 g durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se llevó hasta una saturación del 70% y dejado en reposo en agua-hielo, 12 horas. El precipitado se recuperó por centrifugación y disuelto en 1 ml de agua destilada, posteriormente dializado en agua destilada.

Los extractos concentrados fueron analizados en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes PAGE-SDS, según Leammli (1970). En cada pozo se agregó aproximadamente 20 µg de proteína de muestras y 5 µg de marcador de peso molecular preteñido: miosina 194,665 KDa, β-galactosidasa 116,531 KDa, albúmina sérica bovina 97,220 KDa, ovoalbúmina 50,195 KDa, anhidrasa carbónica 37,620 KDa, inhibidor de tripsina de soya 29,284 KDa, lisozima 20,010 KDa y aprotinina 7,150 KDa. El peso molecular de cada banda se calculó utilizando el método de Weber y Osborn (1969).

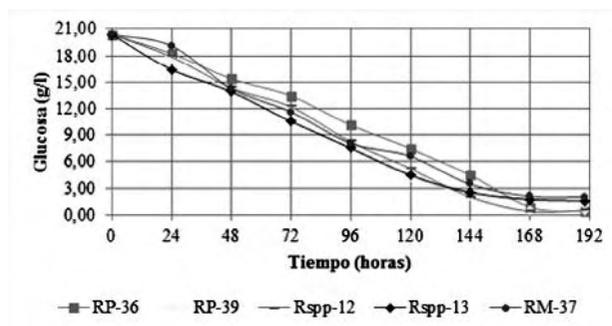
La actividad enzimática de los extractos concentrados fue evaluada en un zimograma según el método modificado de Egitto (2007) y Leammli (1970). El gel de resolución se preparó al 12% de acrilamida con 0,1% de caseinato de sodio. Las electroforesis se realizaron a 200 voltios durante 30 min, utilizando un equipo Mini-Proteam III (Bio-Rad). Se agregaron 20 µg de muestras en cada pozo. Después de la migración electroforética el gel fue lavado dos veces con Triton X-100 (2%

v/v) durante 30 minutos. Los geles lavados fueron incubados a 37°C en buffer fosfato (pH 5,4) durante 18 horas, después de este tiempo fueron teñidos en una solución de azul de Coomassie y posteriormente fueron desteñidos.

## Resultados y discusión

### Producción de enzimas coagulantes por las cepas de *Rhizomucor spp*

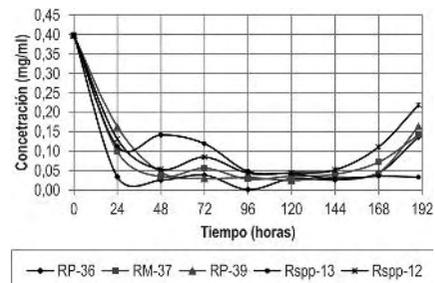
La variación de la concentración de glucosa del medio cultivo durante la incubación, fue similar para todas las cepas evaluadas, mostrando la misma tendencia (figura 1) y tasas de consumo de glucosa (tabla 1). Un comportamiento similar fue registrado por la cepa *Mucor miehei* en un medio estándar utilizando glucosa y almidón soluble como fuente principal de carbono (Osorio *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Consumo de glucosa del medio de cultivo por las cepas *Rhizomucor spp* durante la incubación a 37°C.

Durante las primeras 48 horas, la concentración de proteínas en el medio de cultivo disminuyó desde 0,4 mg/ml hasta valores aproximados de 0,04 mg/ml, para cuatro de las cepas (RP-36, RP-37, Rssp-12 y RP-39) (figura 2), manteniéndose constante hasta las 144 horas, momento en el cual se registra un incremento. En el caso de la cepa Rssp-13 se observó disminución en la concentración de proteínas durante las primeras 24 (0,11 mg/ml) y un incremento a las 48h, (0,148 mg/ml), tiempo en el cual disminuye hasta concentraciones de 0,05 mg/ml (96 h), valor que permanece constante hasta finalizado el tiempo de incubación.

Los aumentos en las concentraciones de proteínas en los medios de cultivo (figura 2) coincidieron con la máxima actividad coagulante registrada por los extrac-



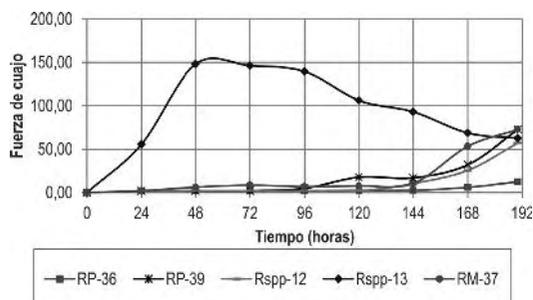
**Figura 2.** Variación del contenido de proteína en el medio de cultivo durante la incubación a 37°C de las cepas de *Rhizomucor*.

tos crudos de cada cepa (figura 3). El mayor valor de actividad coagulante se obtuvo con la cepa Rssp-13 (148,15 FC) a las 48 horas, aproximadamente el doble del valor de las actividades obtenida con la cepa RM-37 y RP-39 de 72,73 FC, registradas a las 190 horas de incubación, mientras que las cepas Rssp-12 y RP-36 presentaron actividades coagulantes de 57,14 FC y 12,50 respectivamente en las mismas condiciones. La máxima actividad coagulante de cada cepa en estudio, fueron inferiores a los registrado por una cepa de *Mucor miehei* (594,19 FC, en un tiempo 45 h), cultivado en un medio de cultivo estándar de laboratorio (1,8% de almidón soluble, 1,8% de glucosa monohidratada y 0,2 % fosfato diácido de potasio, 3,1 % extracto de malta, 0,8 % bactopectona y 0,8 % caseína) (Osorio *et al.*, 2008). En todos los caso en las primeras horas de cultivo, la caseína presente en el medio fue utilizada como fuente nitrógeno para el crecimiento de las cepas, mientras que el incremento posterior en la concentración de proteínas se atribuye a la síntesis y excreción de enzimas extracelulares entre ellas las que presentan actividad coagulante de la leche. El hecho de que la cepa Rssp-13 muestre la mayor actividad, es indicativo que bajo las condiciones de cultivo utilizadas posee mayor capacidad para la excreción de proteínas y particularmente de proteasas con actividad coagulante.

En términos generales las tendencias en el consumo de las principales fuentes carbono (glucosa) y nitrógeno (caseína), así como la producción de proteasas con actividad coagulante de las cepas objeto de estudio, indican que la tasa de consumo de glucosa no debe ser un factor que influye en la excreción de las enzimas, no así su concentración en el medio de cultivo. A concentraciones de glucosa 3-4 g/l y 0,05 mg/ml de proteínas en el medio, se observa el mayor incremento de la excreción en cuatro de las cepas. Mientras que

**Tabla 1.** Tasa de consumo de glucosa de las distintas cepas de *Rhizomucor*

| Cepa  | RP-36 | RM-37 | RP-39 | Rssp-13 | Rssp-12 |
|---|-------|-------|-------|---------|---------|
| Tasa de consumo (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | 0,115 | 0,116 | 0,124 | 0,124   | 0,115   |



**Figura 3.** Actividad coagulante de la leche registradas por las cepas de *Rhizomucor spp* durante la incubación a 37°C.

la cepa Rsp-13 a concentraciones de 15g/l y 0,1 mg/l de proteínas en el medio, produce la mayor excreción de proteínas coagulantes. Estos resultados indican que los niveles de glucosa (fuente de carbono) y proteínas (fuente de nitrógeno) pueden estar implicados en la regulación de la excreción de proteínas durante el crecimiento. Cuatro de las cepas son reguladas de una forma similar, la cepa Rsp-13 muestra un mecanismo menos reprimido por glucosa.

### Comparación de la capacidad productiva

Los resultados mostrados en la tabla 2 indican que bajo condiciones similares de cultivo la cepa Rsp-13 presenta mayor productividad, índice FC/U y actividad específica que las demás cepas estudiadas, esta condición podría variar según las condiciones y formulación del medio de cultivo, por lo que se requiere una evaluación más amplia de estas cepas.

El análisis de varianza para los valores de productividad de las cepas, confirmó la existencia de diferencia significativa entre ellas (tabla 3). La comparación de medias determinó que la cepa Rsp-13 de mayor productividad ( $3,0857 \pm 0,1368$  FC/h) y la cepa RP-36 de menor productividad ( $0,0657 \pm 0,0038$  FC/h), presentaron diferencias significativas entre sí y con el resto de las cepas evaluadas, las cuales registraron valores intermedios, comprendidos en un rango de  $0,3000 \pm 0,0265$  y  $0,3833 \pm 0,097$  FC/h sin diferencias significativas entre ellas. Los valores de productividad de las cinco cepas en estudio, fueron inferiores a la registrada por la cepa *Mucor miehei* (13,59 FC/h) (Osorio et al., 2008), probablemente debido a la diferencia de los medios utilizados.

De acuerdo al análisis de varianza y la comparación de medias para los índices FC/U, arrojó diferencias significativas entre todos los extractos enzimáticos crudos (tabla 4), siendo el de la cepa Rsp-13 de mayor índice ( $142,60 \pm 1,18$ ) y RP-36 de menor valor ( $17,86 \pm 1,13$ ), el resto registró valores intermedios de  $60,33 \pm 1,1$ ;  $55,00 \pm 2,29$  y  $49,78 \pm 1,38$  para los extractos enzimáticos crudos de las cepas RM37, Rsp-12 y RP39 respectivamente.

**Tabla 2.** Productividad, índice FC/U y actividad específica de cada cepa de *Rhizomucor* evaluadas.

| Cepas  | Productividad (FC/h) | Índice FC/U | Actividad específica (FC/mg) |
|--------|----------------------|-------------|------------------------------|
| RP-36  | 0,064                | 17,80       | 91,11                        |
|        | 0,063                | 19,02       | 89,12                        |
|        | 0,070                | 16,76       | 96,13                        |
| RM-37  | 0,380                | 58,49       | 504,72                       |
|        | 0,288                | 61,05       | 551,62                       |
|        | 0,482                | 61,45       | 490,01                       |
| Rsp-13 | 3,064                | 143,90      | 1.076,01                     |
|        | 2,961                | 141,60      | 1.015,30                     |
|        | 3,232                | 142,30      | 1.094,71                     |
| RP-39  | 0,340                | 51,02       | 474,55                       |
|        | 0,420                | 50,02       | 400,59                       |
|        | 0,390                | 48,30       | 465,09                       |
| Rsp-12 | 0,290                | 53,00       | 272,56                       |
|        | 0,330                | 54,50       | 260,99                       |
|        | 0,280                | 57,50       | 253,86                       |

**Tabla 3.** Análisis de varianza para la productividad de las cepas de *Rhizomucor*.

| Fuente | GL | SC       | CM      | F      | P     |
|--------|----|----------|---------|--------|-------|
| Cepa   | 4  | 19,0537  | 4,76343 | 781,47 | 0,000 |
| Error  | 10 | 0,06095  | 0,0061  |        |       |
| Total  | 14 | 19,11466 |         |        |       |

G.L: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de prueba, P: estadístico de significancia

**Tabla 4.** Análisis de varianza para el índice FC/U de los extractos enzimáticos crudos de cada cepa de *Rhizomucor*.

| Fuente | GL | SC        | CM      | F        | P     |
|--------|----|-----------|---------|----------|-------|
| Cepa   | 4  | 25.792,00 | 6.448,0 | 2.601,76 | 0,000 |
| Error  | 10 | 24,78     | 2,48    |          |       |
| Total  | 14 | 25.816,78 |         |          |       |

G.L: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de prueba, P: estadístico de significancia

Al igual que los parámetros anteriores, el análisis de la varianza para la actividad específica, determinó la existencia de diferencia significativa entre los extractos enzimáticos crudos (tabla 5). La comparación de medias determinó que los extractos enzimáticos crudos de la cepa Rsp-13 de mayor actividad específica ( $1.062,00 \pm 41,5$  FC/mg) y RP-36 de menor actividad específica ( $92,1 \pm 3,6$ ), presentaron diferencias significa-

tivas entre sí y con el resto de los extractos enzimáticos, mientras que los de las cepas RM-37 y RP-39 no presentaron diferencias significativa entre sí ( $515,53 \pm 32,2$  y  $446,74 \pm 40,2$  respectivamente), pero si con la cepa Rsp-12 quien registro una actividad específica de  $262,59 \pm 9,4$  FC/mg.

**Tabla 5.** Análisis de varianza para la Actividad Específica de los extractos enzimáticos crudos de cada cepa de *Rhizomucor*.

| Fuente | GL | SC        | CM      | F      | P     |
|--------|----|-----------|---------|--------|-------|
| Cepa   | 4  | 1.616.324 | 40.4081 | 450,89 | 0,000 |
| Error  | 10 | 8.962     | 896     |        |       |
| Total  | 14 | 162.5286  |         |        |       |

G.L: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; F: estadístico de prueba, P: estadístico de significancia

### Peso molecular de los extractos enzimáticos

El extracto enzimático de la cepa Rsp-13 parcialmente purificado, presentó dos bandas de 22,6 y 46,52 KDa (carril 4 - figura 4a), siendo muy similar en número a las presentes en los extractos Rsp-12 y RP-36 (carriles 2 y 3 - figura 4a), de un rango de 42 y 50 KDa (bandas superiores); 22,2 y 20,1 respectivamente para las bandas inferiores, estos resultados difieren de lo reportado por Preetha & Boopathy (1997), cuyos extractos crudo y parcialmente purificado de *Rhizomucor miehei*, revelaron más de dos bandas en los geles de electroforesis. La cepa RM-37 (carril 5 - figura 4a) presentó una proteína adicional de 194,1 KDa, mientras que el extracto RP-39 mostró cuatro bandas de 23,5; 39,6, 51,2 y 193,8 KDa. Otros estudios han mostrado sucesiones de bandas en geles de poliácridamida en la caracterización de extractos (crudos y tratados de sulfato de amonio) provenientes de cultivos de cepas de *Mucor* y *Rhizomucor pusillus* (Nouani, Moulti- Mati, Belbraouet & Bellal, 2011).

Todos los perfiles de las proteínas excretadas muestran la diferencia existente entre las cepas estudiadas, mos-

trando cada una un perfil característico. La actividad proteolítica presente en cada extracto está asociada a las proteínas de 40 – 50 KDa y 22 KDa, correspondientes a los extractos Rsp-12, Rsp-13, RM-37 y RP-39 (carriles 2, 5, 7 y 9 de la figura 4b), no así para el extracto RP-36 (carril 3), donde el halo de hidrólisis apenas se puede apreciar. Las bandas calculadas en 194,1 y 193,8 KDa de las cepas RM-37 y RP-39 no presentaron actividad bien definida en el zimograma (carriles 7 y 9 de la figura 4b). La intensidad de la actividad enzimática registradas por las cepas Rsp-13 y RP-36 en el zimograma se corresponden con la capacidad de producción de enzimas coagulantes evaluadas en estas dos cepas, la cepa Rsp-13 presenta la mayor intensidad.

### Conclusión

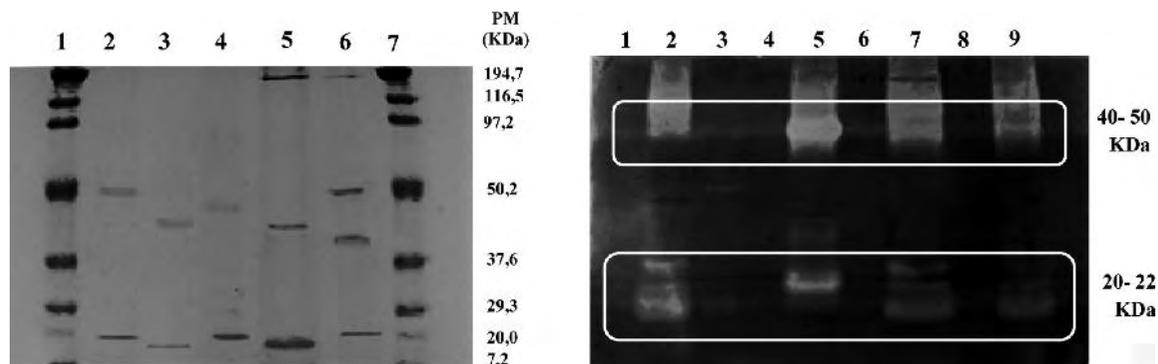
Todas las cepas evaluadas en este estudio mostraron tener capacidad para producir enzimas con actividad coagulante de la leche, excepto la cepas de *Rhizomucor pusillus* RP-36, mientras que la cepa *Rhizomucor* spp BIOMI-13, presentó la mayor actividad específica, índice de productividad y relación FC/U entre las cepas evaluadas, siendo la de mayor capacidad para producir enzimas con actividad coagulante.

### Agradecimiento

Los autores agradecen a la Fundación CIEPE y al Laboratorio de Biotecnología de Microorganismo “Sixto David Rojo”, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, quienes apoyaron y financiaron la realización de este trabajo.

### Referencias bibliográficas

- Bollang, D., & Edelstein, S. (1991). *Proteins methods*. Geneva, Switzerland: Wiley-Liss.
- Cheng, Q., Bai, X., & Wang, Y. (2008). Isolation and fermentation condition of milk-clotting enzyme producing strain from glutinous rice wine. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(6), 999-1003.
- Egito, A., Girardet, J., Laguna, L., Poirson, C., Molle, D., Miclo L., Humbert G., & Gaillard J. (2007). Milk-clotting activity of en-



**Figura 4.** Electroforesis en geles de poliácridamida: (a) PAGE-SDS. Carriles: 1 y 7 Marcador de peso molecular; 2. Rsp-12; 3. RP-36; 4. Rsp-13; 5. RM-37; 6. RP-39. (b) Zimograma. Carriles: 2. Rsp-12; 3. RM-36; 5. R-spp-13; 7. RM-37; 9. RP-39.

- zyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal*, 17, 816-825. doi:10.1016/j.idairyj.2006.09.012.
- Foda, M., Moharam, M., Ramadan, A., & El-Bendary, M. (2012). Over Production of Milk Clotting Enzyme from *Rhizomucor miehei* Through Adjustment of Growth Under Solid State Fermentation Conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(8), 579-589.
- Jacob M., Jaros D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x
- Khademi, F., Abachi, S., & Malekzadeh, F. (2013). Semi-purification and kinetic study of microfungus rennet biosynthesized by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* using solid-state fermentation system: Concentration methods and determinant factors in clotting activity. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 167-174.
- Khademi, F., Abachi, S., Mortazavi, A., Ehsani, M.A., Tabatabaei, M.R., & Malekzadeh, F.A. (2013). Optimization of Fungal Rennet Production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis*. Under Solid Substrate Fermentation system. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(2), 115-121.
- Khademi, F., Abachi, S., Mortazavi, A., Ehsani, M. A., Tabatabaei, M.R., & Malekzadeh F. (2013). Screening and isolation of substitute-rennet producing thermophilic phycomycetes, by modified Warcup method and improved selective medium. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 2(2), 30-37.
- Leammli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Maheshwari, R., Bharadawaj, G., & Mahalingeshwara, K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzyme. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 461-488.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., & Da Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chemistry*, 120, 87-93.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Nouani, A., Moulti- Mati, F., Belbraouet. S., & Bellal, MM. (2011). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: Method comparison. *African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1655-1665.
- Osorio, A., Gómez, N., & Sánchez, C. (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del mohó *Mucor miehei*. *Revista de la Facultad de Ingeniería*. Universidad de Antioquia, 45, 17-26.
- Panouillé M., Nicolai T., Benyahia L., & Durand D. (2005). Aggregation and gelation of casein sub-micelles. In: Dickinson E editors. *Food Colloids. Interactions, microstructure and processing*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Preetha. S., & Boopathy, R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 573-578.
- Ruiz, J. (2005). *Extracción y Caracterización de Proteasas de Especies Vegetales Nativas y su Potencial Utilización en Quesería*. (Tesis Licenciatura). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Weber K., & Osbor M. (1969). The reability of molecular weigth determinations by dodecylsulfate-polycrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406-4412.
- Shieh, C., Phan Thi, L., & Shihb, I. (2009). Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 85-91.
- Sathya, R., Pradeep, B., Angayarkanni, J., & Palaniswamy, M. (2009). Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 788-794.
- Yegin, S., Fernández-Lahore, M., Guvenc, U., & Goksungur, Y. (2010). Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6380-6386.

# Variabilidad interspecífica de duraznos (*Prunus pérsica* L. Batsch.) y ciruelos (*Prunus domestica*) usando RAMs

## Intraespecific variability of peach (*Prunus persica* L. Batsch.) and plums (*Prunus domestica*) using RAMs

Ana Cruz Morillo C. \*, Yacenia Morillo C. \*\*, Leonardo González M. \*\*\*, Iván Adiel A. \*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.44644

### Resumen

Se seleccionó una muestra de 41 materiales de *Prunus* de la colección de caducifolios de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, para evaluar su variabilidad genética usando ocho marcadores Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). Se generaron un total de 121 alelos con pesos moleculares entre 260 y 1000 Kb. Se formaron tres grupos, a un coeficiente de similitud de 0.75, de acuerdo a las características del fruto y a la especie, encontrándose en el grupo II a los materiales de ciruelo. El porcentaje de loci polimórficos varió entre 71 y 99% para los cebadores CGA y CCA, respectivamente. El valor promedio de heterocigosidad fue de 0.22, mucho más bajo que los encontrados en otros estudios de diversidad genética en el género *Prunus*. La técnica RAMs mostró ser una herramienta útil para evaluar la diversidad genética en frutales caducifolios, al discriminar a los materiales en tres grupos e identificar el alto grado de consanguinidad que existe entre las diferentes especies de *Prunus* lo cual debe ser aprovechado dentro de las estrategias de hibridación que busquen la obtención de nuevos y mejores materiales.

**Palabras claves:** *Prunus*, Diversidad genética, Microsatélites RAMs, caducifolios

### Abstract

A sample of 41 *Prunus* materials from the deciduous collection of the Pedagogical and Technological University of Colombia was selected to evaluate its genetic diversity using eight primers for Random Amplified Microsatellite (RAMs). A total of 121 alleles were generated with molecular weights ranging between 260 and 1000 Kb. Three groups were formed, a similarity coefficient of 0.75, according to fruit characteristics and specie, found plum materials in group II. The percentage of polymorphic loci ranged from 71 to 99% for the primers CGA and CCA, respectively. The average value of heterozygosity was 0.33, much lower than values found in other genetic diversity studies in the genus *Prunus*. The RAMs technique showed to be a useful tool for assessing genetic diversity in deciduous fruit, discriminate the materials into three groups and identify the high degree of consanguinity between different *Prunus* species which should be exploited in hybridization strategies looking for obtaining new and improved materials.

**Key words:** *Prunus*, Genetic diversity, Microsatellites RAMs, deciduous.

**Recibido:** septiembre 18 de 2014

**Aprobado:** abril 27 de 2015

### Introducción

La familia Rosaceae, comprende más de 3000 especies, muchas de las cuales son frutales de importancia económica el albaricoquero (*P. armeniaca* L.), el

almendro (*P. dulcis* Mill), el cerezo (*P. avium* L.), y el ciruelo europeo (*P. domestica* L.) y japonés (*P. salicina* L.). (Fan et al., 2013). La producción anual de las especies más importantes de *Prunus* fue para manzanas

\* Ing. Agrónomo. PhD en Ciencias Agropecuarias con énfasis en Fitomejoramiento. Docente Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja (Boyacá, Colombia), ana.morillo@uptc.edu.co.

\*\* Ing. Agrónomo. PhD en Ciencias Agropecuarias con énfasis en Fitomejoramiento. Docente Universidad de los Llanos, Villavicencio (Meta, Colombia), ymorillo@unillanos.edu.co

\*\*\* Estudiante de Maestría en Fisiología Vegetal de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja (Boyacá, Colombia), Leonardo.gonzalez@uptc.edu.co.

\*\*\*\* Ingeniero agrónomo, Universidad de los Llanos, ivanamilmorales@hotmail.com. Autor para correspondencia: ana.morillo@uptc.edu.co.

76.378.738 (Ton), peras 23.580.845 (Ton), duraznos y nectarinas 21.083.151 (Ton), albaricoque 3.956.639 (Ton), cerezas 2.256.519 (Ton), y ciruelos 10.702.744 (Ton) (FAOSTAT, 2014). En el género *Prunus*, además del durazno (*Prunus persicae* (L.) Batsch), también llamado melocotonero, existen otras cuatro especies distintas de melocotonero, *P. davidiana* (Carr.) Franch., *P. mira* Koehne, *P. kansuensis* Rehd. Y *P. ferganensis*, pero solo la especie *P. persica* se cultiva por su fruta (Hancock et al., 2008). Al igual que el ciruelo (*Prunus domestica*), constituyen las especies caducifolias más populares que se cultivan en las zonas templadas de todo el mundo al igual que el durazno, son un grupo diverso de plantas con muchas especies adaptadas a un amplio rango de condiciones ecogeográficas y que han sido cultivadas por siglos (Okie y Hancock, 2008).

La identificación de cultivares y el estudio de relaciones genéticas en estas especies tradicionalmente se basó en características morfológicas, sin embargo en los programas de mejoramiento de *Prunus*, su evaluación es un proceso tedioso debido al período juvenil tan largo, la influencia del estado fenológico en la expresión de las características y la existencia de factores climáticos que afectan su expresión, por estas razones la selección asistida por marcadores moleculares es particularmente útil en estos casos (Ercisli et al., 2011). En *Prunus*, los microsatélites (SSRs) han sido los marcadores más usados para la caracterización de germoplasma (Guarino et al., 2009), determinación de la diversidad genética (Rogatis et al., 2013), manejo de germoplasma (Kamm et al., 2011), identificación de cultivares y fingerprinting (Gulen et al., 2010), determinación de genes de interés (Bouvier et al., 2012) estudios de autoincompatibilidad y poblacional (Marrion et al., 2010) y mapeo genético (Dhanapal et al., 2012). En *Prunus*, los microsatélites desarrollados en una especie han sido usados en diferentes especies, demostrando su transferibilidad y habilidad para detectar polimorfismos (Fan et al., 2013).

Zietkiewick et al. (1994), propusieron un método para medir la diversidad genética en plantas y animales usando cebadores basados en microsatélites. Esta técnica combina los beneficios de los microsatélites y los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Hantula et al. (1996) seleccionaron cuatro cebadores (GT, ACA, CCA y CGA) con una longitud de 18 bases que incluyen un extremo 5' "degenerado" de tres nucleótidos el cual sirve de anclaje para asegurar la unión del cebador al inicio del microsatélite. Ellos denominaron a esta técnica RAM (Random Amplified Polymorphic DNA). Los RAMs se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método es altamente reproducible y permite la detección de polimorfismos en el ADN intra e interespecífico (Muñoz et al., 2008).

Con los marcadores RAMs se estudian poblaciones, se mide la diversidad genética en plantas y animales, se muestra la base de la variación de los individuos,

se permite seleccionar regiones del genoma, analizar la información que se expresa ya que el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado (Mahuku et al., 2002). La metodología se ajusta para pequeños laboratorios en términos de equipos y facilidades de costo, no requiere conocimiento previo de secuencias (Muñoz et al., 2008).

Trabajos sobre caracterización de diversidad genética vegetal sugieren que la técnica RAMs es útil para identificar duplicados en bancos de germoplasma, para establecer grupos o asociaciones entre individuos de una población de acuerdo con la especie, localización geográfica, relaciones filogenéticas, entre otras (Muñoz et al., 2008). Ampliamente utilizado en frutales como la mora (*Rubus glaucus*) en donde diferenció las especies *R. glaucus*, *R. robustus* y *R. urticifolius*, detectó duplicados y encontró alta variabilidad genética en *R. glaucus*, la especie más importante (Morillo et al., 2005); en uchuva estos marcadores encontraron alta diversidad y dos accesiones de fruto rojo se diferenciaron genéticamente de las amarillas (Bonilla et al., 2008). En guayaba estos cebadores fueron altamente polimórficos y se encontró alta variabilidad en el Valle del Cauca (Sanabria et al., 2006); en mandarina permitió agrupar las accesiones según los tipos mandarino Satsuma, mandarinos Clementinos e híbridos, por lo cual es una herramienta útil para evaluar la diversidad genética en el género *Citrus* (Morillo et al., 2009; Mora et al., 2013).

Morillo et al. (2014), utilizando ocho cebadores Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) evaluaron la diversidad genética de 31 materiales de *Prunus* de la colección de caducifolios de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, con un coeficiente de similaridad de 0.75 se formaron tres grupos de acuerdo principalmente con las características del fruto, con un valor de heterocigosidad de 0.22. La técnica RAMs fue útil para evaluar la diversidad genética en especies caducifolias.

Dentro de este contexto, este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal hacer un análisis de la variabilidad interespecífica con marcadores microsatélites RAMs de los materiales de durazno y ciruelo, de la colección de caducifolios que tiene la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, como una aproximación hacia el planteamiento de estrategias de hibridación e identificación de materiales élite.

## Materiales y métodos

Se evaluaron un total de 28 accesiones de durazno, 11 de ciruelo, 2 de albaricoque (*Prunus armeniaca*) y un almendro (*Prunus dulcis*) pertenecientes a la colección de caducifolios de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Tunja, establecido en la granja experimental de Tanguavita, Paipa localizada a 36 Km de la ciudad de Tunja con una latitud Norte de 5° 47' 04" y longitud Oeste de 73° 07' 17" con una temperatura promedio de 15°C (tabla 1).

**Tabla 1.** Materiales de *Prunus* de la colección de caducifolios de la Universidad Pedagógica de Colombia, utilizados para la evaluación de la diversidad genética.

| Nº | Material              | Clasificación según el tipo de Fruto** |
|----|-----------------------|--|
| 1  | M-11                  | Sin clasificación                      |
| 2  | Zapote                | Sin clasificación                      |
| 3  | Premier               | Sin clasificación                      |
| 4  | Zapallo               | Sin clasificación                      |
| 5  | Florida Kind          | Var. Durazno propiamente dicha.        |
| 6  | Diamante              | Var. Durazno propiamente dicha.        |
| 7  | 8631-C                | Sin clasificación                      |
| 8  | Pero                  | Sin clasificación                      |
| 9  | Blanco Común          | Var. Durazno propiamente dicha         |
| 10 | Rubidoux              | Var. Durazno-melocotón.                |
| 11 | Marly                 | Sin clasificación                      |
| 12 | T-Snow                | Sin clasificación                      |
| 13 | Variedad Oro          | Sin clasificación                      |
| 14 | Pezón de Venus        | Sin clasificación                      |
| 15 | Melocotonero amarillo | Sin clasificación                      |
| 16 | Monarca               | Sin clasificación                      |
| 17 | Dorado                | Var. Durazno propiamente dicha.        |
| 18 | Princesa              | Sin clasificación                      |
| 19 | Rey Negro             | Var. Durazno-melocotón.                |
| 20 | Riograndense          | Var. Durazno propiamente dicha.        |
| 21 | Melocotonero rojo     | Sin clasificación                      |
| 22 | Coral                 | Sin clasificación                      |
| 23 | Cardenal              | Sin clasificación                      |
| 24 | Elbertha gigante      | Sin clasificación                      |
| 25 | Jarillo               | Var. Durazno-melocotón.                |
| 26 | Conservero            | Var. Durazno propiamente dicha.        |
| 27 | Camuezo               | Var. Durazno propiamente dicha.        |
| 28 | Melocotón Rosado      | Sin clasificación                      |
| 29 | Early                 | Sin clasificación                      |
| 30 | Real Beauty           | Var.Ciruelo-rojo                       |
| 31 | Beauty                | Var.Ciruelo-rojo                       |
| 32 | Ecuatoriano           | Var.Ciruelo-amarillo                   |
| 33 | Chileno-2             |  |
| 34 | Horvin                | Var.Ciruelo-rojo                       |
| 35 | Methey                | Var.Ciruelo-rojo                       |
| 36 | Chileno               | Sin clasificación                      |
| 37 | Morado                | Sin clasificación                      |
| 38 | Reina Claudia         | Sin clasificación                      |
| 39 | Gold Fruly            | Sin clasificación                      |
| 40 | Albaricoque Bulida    | Sin clasificación                      |
| 41 | Albaricoque Canino    | Sin clasificación                      |
| 42 | Almendro              | Sin clasificación                      |

\*\* Campos (2013)

## Caracterización molecular

La caracterización molecular se hizo en los laboratorios de investigación en Biología Molecular, BIO-PLASMA y GEBIMOL, de la Universidad Pedagógica de Colombia, Tunja. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). Los ADN totales se visualizaron en geles de agarosa al 0.8%, en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electroforesis Gel System. Para determinar la concentración de ADN se utilizó el fluorómetro Hoefer Dyna Quant 200 y se diluyó en agua tipo HPLC a un volumen total de 100 µl a 10 ng/µl y se almacenó a -20 °C. Para el análisis RAMs se utilizaron ocho cebadores sintetizados por Technologies Inc. Bioneer (tabla 2). Para la reacción de amplificación con RAMs se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrífuga (1.5 ml) para un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 µM y ADN genómico 10ng.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la técnica Microsatélites RAMs.

| Cebadores | Secuencia (5´ a 3´)    |
|-----------|------------------------|
| CCA       | DDB(CCA) <sub>5</sub>  |
| CGA       | DHB(CGA) <sub>5</sub>  |
| ACA       | BDB(ACA) <sub>5</sub>  |
| GT        | VHV(GT) <sub>5</sub> G |
| AG        | HBH(AG) <sub>7</sub> A |
| CT        | DYD(CT) <sub>7</sub> C |
| TG        | HVH(TG) <sub>7</sub> T |
| CA        | DBDA(CA) <sub>7</sub>  |

Las siguientes designaciones se usan para los sitios generados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ. Research, Inc). La desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 5 min; desnaturalización a 95 °C por 30 seg, hibridación a una temperatura de 50 °C (cebador AG ACA y CA), 55 °C (cebador CCA-TG-CT) y 58 °C (cebador GT-CGA) durante 45 seg, una extensión de 72 °C por 2 min, 37 ciclos desde la desnaturalización a extensión y por último una extensión a 72 °C durante 7 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida 37:1 (acrilamida: bisacrilamida) al 7 % a 150 v por 1 h en una cámara pequeña de DNA Sequencing System, FB-SEQ-3545 de Fisher Biotechnologies. La tinción se realizó usando sales de plata siguiendo el protocolo de Cres *et al.* (2001).

## Análisis estadístico

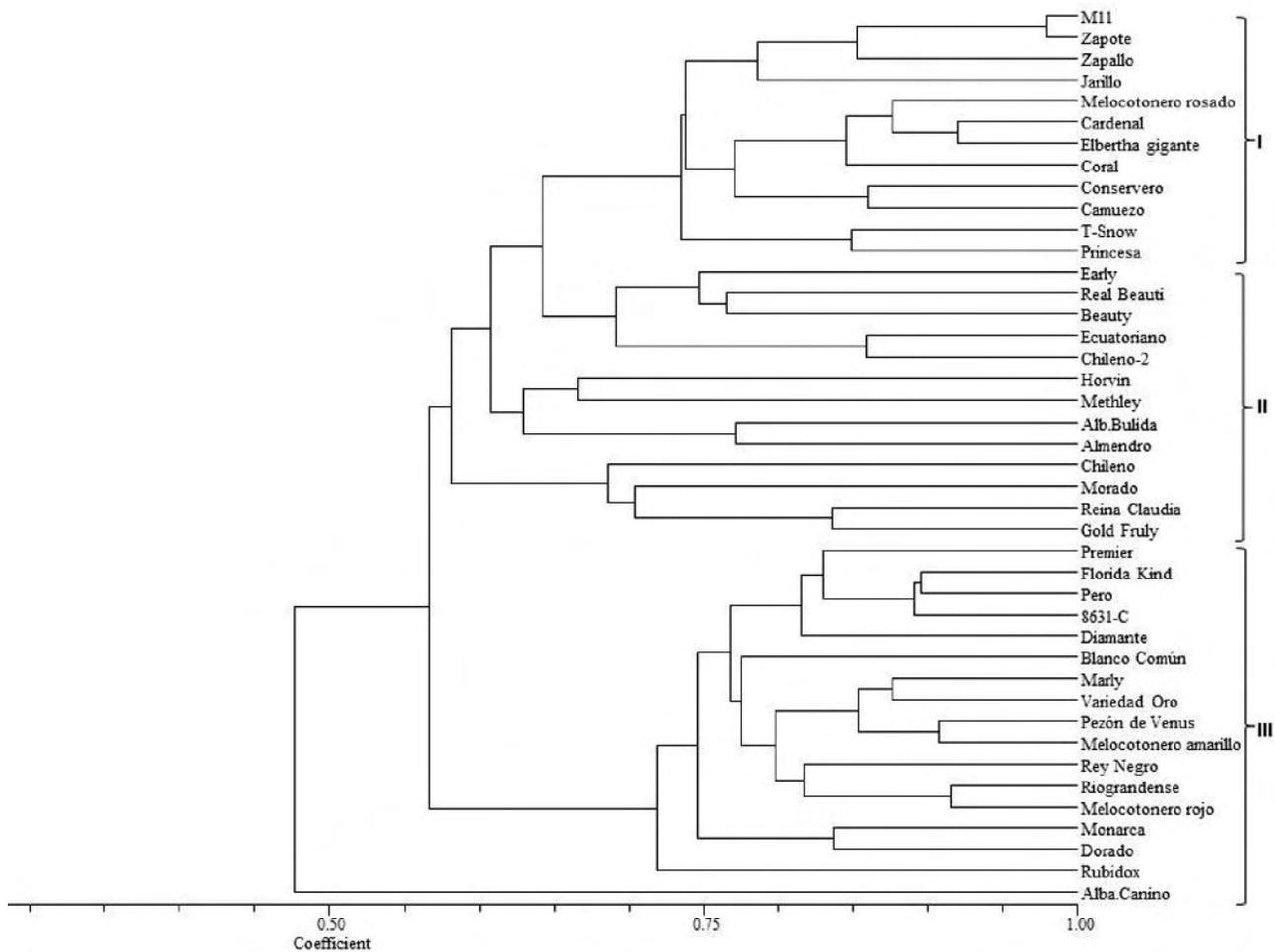
Se generó una matriz binaria de presencia (uno) y ausencia (cero). Para la selección de bandas polimórficas se consideró como locus polimórfico aquel en el cual la frecuencia del alelo más común fue menor que el 95%. La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979). El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS-pc (versión 2.02g, 98) utilizando el UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma se construyó con el programa TREE de NTSYS-pc (versión 2.02g, 98). Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad insesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFGA (Tools For Population Genetic Analices, versión 1.3, 1997). Se utilizó el paquete estadístico AMOVA®, por medio del programa AMOVA PREP para llevar a cabo el análisis de varianza molecular (AMOVA) y así poder determinar las diferencias entre y dentro de los grupos formados. Se determinó el f estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95 %.

## Resultados y Discusión

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li, a un nivel de similitud de 0.75, diferenció a los materiales en 3 grupos (figura 1).

Los duraznos se clasifican por la presencia de tricomas en la piel y por la adherencia de la pulpa al hueso en duraznos propiamente dichos (*Prunus pérsica* L.) son aquellos que tienen la piel aterciopelada y la pulpa unida al hueso; el durazno-melocotón (*Prunus pérsica* L.) es de piel aterciopelada, pero la pulpa no está unida al hueso, se llaman duraznos abridores o priscos y los duraznos-nectarinos (*Prunus pérsica* var. Nectarino) es de piel lisa y la pulpa no unida al hueso, se les denomina duraznos calvos (Campos *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta esta clasificación en el Grupo I, se encuentran las variedades de durazno propiamente dichas como el Conservero, de pulpa amarilla con coloración rojiza alrededor del hueso, tamaño mediano fue introducido del Ecuador y el Camuezo, de pulpa amarilla, producción prolífica, se utiliza como patrón para todas las variedades de durazno y algunas de ciruelo. El Jarillo es una variedad que se importa de Venezuela, de piel y pulpa amarilla, en muchos viveros se usa como patrón (Campos *et al.*, 2013).

A nivel mundial, existen más de 15,000 variedades de durazno (Castro *et al.*, 1998). En Colombia se destacan las variedades fresa morado, Pezón de Venus, Fresa blanco, Elberta gigante, Rubidoux, Frank, Ventura, Diamante, Riograndense, Dorado, Conservero amarillo y Zapallo (Ordoñez, 2007), algunas de las cuales se encuentran dentro de este grupo.



**Figura 1.** Dendrograma de 42 materiales de *Prunus* basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li y calculado con ocho marcadores RAMs, con el método de clasificación UPGMA, SAHN y TREE de NTSYS-pc Versión 1.8 (Exeter Software, NY, USA).

La mayor parte de los ciruelos evaluados en este estudio se encuentran conformando el grupo II. De acuerdo con el color de la piel del fruto, se han clasificado en amarillos como la variedad Ecuatoriana, que tiene bajo contenido de pruina y se propaga vegetativamente, para obtener patrones e injertar variedades de ciruelo como Kelsey, Sangre Toro, Duarte y Beauty, que no son compatibles con el durazno común, que es el patrón usado comúnmente; y rojos como las variedades Beauty, con pruina, forma acorazonada, comercialmente es la más abundante en el mercado, aunque es muy susceptible a la manipulación poscosecha; Methley, de pulpa roja con sabor dulce, muy prolífica y de producción temprana, a pesar de su tamaño no tiene problemas de mercado; Horvin, piel roja con pruina, prolífica y de cosecha temprana, se puede llegar a obtener dos cosechas por año, principalmente en zonas de régimen bimodal de lluvias (Campos *et al.*, 2013).

El patrón más utilizado en la injertación de ciruelo es el Durazno Blanco Común, sin embargo, presenta in-

compatibilidades con algunas variedades de ciruelo. El Flor Blanca también se utiliza pero con los mismos problemas anteriores. Por lo cual se reemplazan con ciruelos Ecuatoriano, Rojo Japonés o mirabolano, éste último se caracteriza por ser rústico, de fruta de color rojo, pequeña y hoja pequeña sin ningún valor comercial con fruta fresca. El almendro es una especie que presenta buena compatibilidad en la injertación con las diferentes variedades de ciruelo, por lo cual se encuentra haciendo parte de este grupo (Campos *et al.*, 2013).

En el grupo III, encontramos entre las variedades más importantes de durazno a la variedad Florida que se ha adaptado a las condiciones del Cauca, y es sembrada a los 2400 m.s.n.m en los municipios de Silvia y Sotará. Sus frutos son de buena calidad, muy jugosos de color rojo y pulpa amarilla, la producción empieza a los tres años después de la siembra y puede producir durante 20 años (Serna y Oliva, 1999). Las variedades Dorado y Diamante se caracterizan por tener una piel amarilla

con ligera pigmentación roja, pulpa amarilla oro con coloración rojiza alrededor del hueso. La primera presenta buenas características para la industrialización, y por su buen contenido de azúcar, es excelente para el consumo en fresco y la segunda se caracteriza porque la planta es muy vigorosa y productiva. La variedad Oro con un color amarillo atractivo presenta buenas propiedades organolépticas (Baiza, 2004).

Dentro de las variedades de durazno-melocotón, tenemos a la Rubidoux, por ser resistente a la manipulación poscosecha, tener una pulpa amarilla con coloración rojiza y una forma ligeramente redondeada; y al Rey Negro de piel amarilla con manchas rojas opacas, presencia de un pezón muy pronunciado, el cual le trae problemas en la manipulación poscosecha (Campos, 2013). El albaricoque canino, fue material que presentó menor similitud con el resto de los materiales evaluados, aunque se ha reportado mayor afinidad con otras especies del género *Prunus* (Gallego, 2010).

En términos generales, los agrupamientos de los materiales de duraznos evaluados, con los marcadores RAMs correspondieron de acuerdo a la especie evaluada, y a las características del fruto al igual que en otros estudios de diversidad genética usando marcadores microsatélites en *Prunus* (Stanys *et al.*, 2008). Sin embargo también se observa el alto grado de similitud entre especies como el durazno y el ciruelo y de este último con el albaricoque, lo cual puede ser útil para el establecimiento de estrategias de hibridación dentro de un programa de mejoramiento genético de *Prunus*.

Los ocho cebadores RAMs utilizados para la caracterización molecular en durazno, generaron un total de 121 alelos que fluctuaron entre 9 para el cebador GT y 26 para el cebador ACA, con pesos moleculares entre 260 y 1000 kb. El porcentaje de loci polimórficos varió entre 71 a 98.7% para los cebadores CGA y CCA, respectivamente (tabla 3). El número de alelos se considera adecuado para estimar parámetros genéticos al compararlo con los resultados obtenidos en otras especies de *Prunus* (Stanys *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2009). El cebador CCA fue el que mayor aporte hizo a la variación genética observada, Fst de 0.65 (tabla 4) lo que significa que puede ser útil para lograr mayor diferenciación entre los materiales del género *Prunus*.

Los valores de heterocigosidad estuvieron comprendidos entre 0.24 para el cebador CGA y 0.42 para el CCA. El valor promedio de heterocigosidad para todos los materiales evaluados en general fue de 0.33 mucho más bajo que los encontrados en estudios de diversidad genética usando SSRs realizados por, Carrasco *et al.* (2012) en 29 cultivares élites de ciruelo Japonés (*Prunus salicina*) y 4 cultivares de *Prunus* (0.80); Barac *et al.* (2014) en 35 accesiones de *Prunus cerasus* (0.39); Fon *et al.* (2013) en 94 cultivares de durazno y nectarinas (0.45). Sin embargo fue más alto que los valores encontrados por Barac *et al.* (2014) al evaluar 7 accesiones de *P. mahaleb* (0.28), 22 de *P. avium* (0.31),

4 de *P. fruticosa* (0.31), 4 de *P. serrulata* (0.28) y 4 de *P. persica* (0.19).

**Tabla 3.** Heterocigosidad estimada (He), número y porcentaje de loci polimórficos para los ocho cebadores RAMs evaluados con 42 materiales de *Prunus* evaluados.

| Cebador         | Nº Loci | He estimada | % Loci Polimórficos |
|-----------------|---------|-------------|---------------------|
| ACA             | 26      | 0.28        | 88.5                |
| AG              | 12      | 0.39        | 98.5                |
| CA              | 15      | 0.34        | 93.3                |
| CCA             | 13      | 0.42        | 98.7                |
| CGA             | 21      | 0.24        | 71.4                |
| CT              | 14      | 0.38        | 85.7                |
| GT              | 9       | 0.40        | 96.5                |
| TG              | 11      | 0.34        | 90.9                |
| Población total | 121     | 0.33        | 89.3                |

Los bajos niveles de heterocigosidad encontrados se atribuyen a los sistemas de apareamiento ya que la mayoría de los cultivares de durazno son autocompatibles lo que favorece los procesos de autofecundación (Sassa *et al.*, 1992). Bajos niveles de polimorfismos también se han encontrado en materiales de cereza dulce (Boskovic y Tobutt, 1997). Esto probablemente refleja una estrecha base genética en el germoplasma de ciruela dulce y de durazno. Sin embargo concuerda con las afirmaciones de Imbert y Lefèvre (2003) quienes consideran que un exceso de heterocigosidad no es muy usual en especies arbóreas y que generalmente esta se ve favorecida por la autoincompatibilidad y por los cruzamientos interespecíficos (Stoeckel *et al.*, 2006). La estrecha base genética utilizada para el desarrollo de cultivares y la existencia de ancestros comunes en los pedigree de duraznos y ciruelas, podrían explicar los resultados encontrados (Okie y Hancock, 2008). En general los bajos niveles de variabilidad son consistentes con los obtenidos usando diferentes marcadores moleculares en especies del género *Prunus* (Aranzana *et al.*, 2010).

El coeficiente de diferenciación genética (Fst) obtenido al evaluar los 42 materiales de *Prunus*, con los ocho marcadores RAMs fue de 0.29, con una desviación estándar de 0.03 (tabla 4). Según Wright (1978), valores de 0.25 muestran gran diferenciación genética, lo cual puede estar reflejado en el alto grado de domesticación que han sufrido estos materiales, ya que la mayoría de ellos corresponden a variedades comerciales. Este valor es más alto que lo encontrado por Carrasco *et al.* (2012) en ciruelo (-0.13) y mucho más alto que en otras especies de polinización cruzada como cereza (0.092; Stoeckel *et al.*, 2006), almendro (0.15; Fathi *et al.*

al., 2008) y albaricoque (0.04; Bourguiba *et al.*, 2010). Lo anterior muestra que las variedades de durazno y ciruelo son genéticamente menos diversas, contrario a los resultados obtenidos por Fon *et al.* (2013), esto se puede explicar teniendo en cuenta la historia evolutiva de las diferentes especies en su proceso de domesticación y su sistema de propagación clonal (McKey *et al.*, 2010), pero también debido a que el durazno es la especie menos polimórfica del género *Prunus* por su condición de autogamia (Font *et al.*, 2014).

**Tabla 4.** Diferenciación poblacional, estadístico  $F_{st}$  para los 42 materiales de *Prunus* evaluados con los ocho cebadores RAMs evaluados.

| Cebador                | $F_{st}$ | SD   |
|------------------------|----------|------|
| ACA                    | 0.21     | 0.02 |
| AG                     | 0.19     | 0.04 |
| CA                     | 0.24     | 0.04 |
| CCA                    | 0.65     | 0.04 |
| CGA                    | 0.13     | 0.03 |
| CT                     | 0.27     | 0.06 |
| GT                     | 0.18     | 0.01 |
| TG                     | 0.40     | 0.05 |
| <b>Población total</b> | 0.29     | 0.03 |

Los marcadores RAMs discriminaron a los materiales en tres grupos a unas distancias genéticas muy reducidas (0.75) mostrando así el grado consanguinidad que existe entre ellos. Carrasco *et al.* (2012) encontró valores de similitud comprendidos entre 0.57 a 0.99 al caracterizar con marcadores SSR e ISSR 29 cultivares de ciruelo Japonés (*Prunus salicina*) y 4 de durazno. También se han encontrado alto valores de similitud entre y dentro de las diferentes especies del género *Prunus* (Yoon *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los tres grupos mostró que la variación se encuentra entre los grupos, que correspondió a una varianza de 75% (tabla 5), el 25% restante se debió al componente varianza genética dentro de los grupos.

La similitud existente entre los diferentes materiales evaluados soporta la idea que existe una alta capaci-

dad para la hibridación y el flujo genético entre las especies de *Prunus* evaluadas. La estrecha base genética usada para el desarrollo de variedades podría explicar estos resultados, pues los materiales estudiados pueden tener un ancestro común entre su pedigree (Okie y Hancock, 2008).

El alto grado de sintenia que se presenta entre los genomas de durazno y ciruelo, como se pudo observar en este estudio, puede ser aprovechado para producción de híbridos ya que hay estudios que muestran como estas dos especies son utilizadas para la generación de nuevos y mejores materiales dentro de estrategias de mejoramiento del género *Prunus* (Frecon, 2006; Reales *et al.*, 2010). El uso de marcadores moleculares, el análisis de secuencias (Scalabrin *et al.*, 2013; Vicedomini *et al.*, 2013) permitirán un estudio más detallado del genoma de las especies de *Prunus* y al vez serán una herramienta útil para complementar y hacer más eficientes las estrategias de hibridación entre las especies del género *Prunus*.

### Conclusión

La caracterización molecular con marcadores RAMs de la colección de duraznos y ciruelos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, mostro que hay un alto grado de similitud entre los materiales evaluados, por lo cual la diversidad fue baja, sin embargo, esto muestra el alto grado de consanguinidad de las especies evaluadas y que puede ser usada eficientemente dentro de esquemas de hibridación que conduzcan hacia la obtención de nuevos y mejores materiales de *Prunus*.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración al grupo de investigación CIDE, a los laboratorios de investigación BIOPLASMA y GEBIMOL, a la Granja Experimental de Tunguavita y la Dirección de Investigaciones, DIN, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Tunja.

### Referencias bibliográficas

- Aranzana, M. J., Abbassi, E. K., Howad, W., & Arus, P. (2010). Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics*, 11(1), 69-79.
- Baíza, V. (2004). Guía técnica del cultivo del melocotón. Programa Nacional de Frutas del Salvador. 46 p.

**Tabla 5.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los grupos formados.

| Fuente Variación | gl | SC      | CM     | %    |
|------------------|----|---------|--------|------|
| Entre Grupos     | 2  | 161,825 | 80,912 | 25%  |
| Dentro Grupos    | 39 | 730,985 | 18,743 | 75%  |
| Total            | 31 | 892,810 |        | 100% |

- Barac, G., Ognjanov, V., Obreht, D., Ljubojevic, M., Bosnjakovic, D., Pejic, I., & Gasic, K. (2014). Genotypic and phenotypic diversity of cherry species collected in Serbia. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(1), 92-108.
- Bonilla, M., Espinosa, K., Posso, A., & Muñoz, J. (2008). Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. *Acta Agronómica*, 57 (2), 109-115.
- Boskovic, R., Russell, K., & Tobutt, K. (1997). Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphytica*, 95(2), 221-228.
- Bourguiba, H., Krichen, L., Audergon, J., Khadari, B., & Farah, N. (2010). Impact of mapped SSR markers on the genetic diversity of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in Tunisia. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(4), 578-587.
- Bouvier, L., Bourcy, M., Boulay, M., Tellier, M., Guérif, P., Denancé, C., Durel, C., & Lespinasse, Y. (2012). A new pear scab resistance gene Rvp1 from the European pear cultivar 'Navara' maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2. *Tree Genetics & Genomes*, 8(1), 53-60.
- Campos, E., Miranda, D., Fischer, G., & Carranza, C. (2013). Los frutales caducifolios en Colombia. Especies y Variedades de hoja caduca en Colombia. 47-65 pp.
- Carrasco, B., C., Moya, M., Gebauer, M., & García, R. (2012). Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(3), 533-543.
- Castro, S., Delgado, Z., Ramírez, F., & Puentes, M. (1998). Manejo Post-cosecha y Comercialización de Durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch). Serie de paquete de Capacitación sobre Manejo de Post-cosecha de frutas y Hortalizas. NRI, DFID, SENA, Convenio SENA Reino Unido. OP Gráficas, Bogotá, Colombia. 372 p.
- Crest, S., Tulman-Neto, A., & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 299-306.
- Dellaporta, S., Wood, J., & Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19-21.
- Dhanapal, A., Martínez, P., Gradziel, T., & Crisosto, H. (2012). First genetic linkage map chilling injury susceptibility in peach (*Prunus persica* L. Batsch) fruit with SSR and SNP markers. *Journal of Plant Science & Molecular Breeding*, 34(1), 1-13.
- Ercisli, S., Agar, G., Yildirim, N., Duralija, B., Vokurka, A., & Karlidag H. (2011). Genetic diversity in wild sweet cherries (*Prunus avium*) in Turkey revealed by SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 1211-1219.
- Fan, L., Zhang, M., Liu, Q., Li, T., Song, Y., Wang, L., Zhang, S., & Wu, L. (2013). Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(6), 1271-1282.
- FAOSTAT (2014). Estadísticas de producción cultivos caducifolios. Consultado en: <http://faostat.fao.org/>.
- Fathi, A., Ghareyazi, B., Haghazari, A., Ghaffari, M., Pirseyedi, S., Kadkhodaei, S., Naghavi, M., & Mardi, M. (2008). Assessment of the genetic diversity of almond (*Prunus dulcis*) using microsatellite markers and morphological traits. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6(2), 98-106.
- Fernández, A., Martí, J., Alonso, M., Espiau, M., Rubio, M., & Socias, R. (2009). Genetic Diversity in Spanish and Foreign Almond Germoplasm Assessed by Molecular Characterization with Simple Sequence Repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(5), 535-542.
- Font, C., Gradziel, T., Gogorcena, y., & Moreno, M. (2014). Phenotypic diversity among local Spanish and foreign peach and nectarine (*Prunus persica* L.) Batsch accessions. *Euphytica*, 197(2), 261-277.
- Frecon, J. (2006). Fruit register list 43: Peach. *HortScience*, 41(5), 1116-1119.
- Gallego, A. (2010). El cultivo del almendro en producción ecológica. Asociación para el Desarrollo Sostenible del Poniente Granadino. 16p.
- Guarino, C., Santoro, S., Simone, L., & Cipriani, G. (2009). *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars. *Genome*, 52(4), 320-337.
- Gulen, H., Ipek, A., Ergin, S., Ackay, M.E. & Eris, A. (2010). Assessment of genetic relationships among 29 introduced and 49 local sweet cherry accessions in Turkey using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(5), 427-431.
- Hancock, J., Scorza, R., & Lobos, G. (2008). Peaches. In: J.F. Hancock (ed), *Temperature Fruit Crop Breeding: Germoplasm to Genomics*. Springer, East Lansing. 455p.
- Hantula, J., Dusabenyagasani, M., & Hamelin, R. (1996). Random Amplified Microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26(3), 159-166.
- Imbert, E., & Lefèvre, F. (2003). Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal Ecology*, 91(3), 447-456.
- Kamm, U., Gugerli, F., Rotach, P., Edwards, P., & Holderegger, R. (2011). Genetic consequences of low local tree densities - Implications for the management of naturally rare, insect pollinated species in temperate forests. *Forest Ecology and Management*, 262(6), 1047-1053.
- Mahuku, G., Henríquez, M., Muñoz, J., & Buruchara, R. (2002). Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology*, 92(6), 580-589.
- Mariette, S., Tavaud, M., Arunyawat, U., Capdeville, G., Millan, M., & Salin, F. (2010). Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs, and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*, 11, 77-93.
- McKey, D., Elias, M., Pujol, B., & Duputié, A. (2010). Ecological approaches to crop domestication. In: GeptsP, BettingerR, Brush SB, FamulaT, McGuirePE, QualsetCO, eds. *Biodiversity in agriculture: domestication, evolution and sustainability*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 456p.
- Mora, S., Morillo, Y., Morillo, A., Caicedo, A., & Muñoz, J. (2013). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de 30 accesiones de mandarina (*Citrus reticulata*) del banco de germoplasma de Corpoica-Palmira. *Investigación Agropecuaria*, 10(2), 161-172.
- Morillo, A., Morillo, Y., Chagüeza, Y., Caicedo, A., Jaramillo, J., Muñoz, O., Arcos, A., Vásquez, E., & Muñoz, J. (2009). Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. *Acta Agronómica*, 58(4), 234-244.
- Morillo, A., Morillo, Y., & Pinzón, E. (2014). Caracterización con RAMs de la colección de durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) existente en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 367-376.
- Morillo, A., Morillo Y., Zamorano, A., Vásquez, E., & Muñoz, J. (2005). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAM de la colección de mora *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. *Acta Agronómica*, 54(2), 15-24.
- Muñoz, J., Morillo, A., & Morillo, Y. (2008). . Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 219-226.
- Nei, M., & Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restricción endonucleasa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(5), 5267-5273.
- Okie, W., & Hancock J. (2008). Plums. In: Hancock J.F. (ed.). *Temperate fruit crop breeding: germoplasm to genomics*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Holland. 337-358 pp.

- Ordóñez, O. (2007). Monografía del durazno, Secretaria de desarrollo Rural. Estado de Puebla. Disponible en: <http://www.sdr.gob.mx/Contenido/CadenasProductivas.pdf>.
- Reales, A., Sargent, D., Tobutt, k., & Rivera, D. (2010). Phylogenetics of Eurasian plums, *Prunus* L. section *Prunus* (Rosaceae), according to coding and non-coding chloroplast DNA sequences. *Tree Genetics & Genomes*, 6(1), 37-45.
- Rogatis, A., Ferrazzini, D., Ducci, F., Guerri, S., & Belletti, P. (2013). Genetic variation in Italian wild cherry (*Prunus avium* L.) as characterized by nSSR markers. *Forestry*, 86(1), 391-400.
- Sanabria, H., García, H., y Muñoz, J. (2006). Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 55(1), 23-30.
- Sassa, H., Hirano, H., & Ikehashi, H. (1992). Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiology*, 33(6), 811-814.
- Serna, D., y Oliva, L. (1999). El cultivo del durazno. Cartilla divulgativa elaborada por CorpoTunía, Corporación para el Desarrollo de Tunía. 25 p.
- Scalabrin, S., Policriti, A., Nadalin, F., Pinosio, S., Cattonaro, F., Vendramin, E., Aramini, V., Verde, I., Bassi, D., Pirona, R., Rossini, L., Cipriani, G., Testolin, R., & Morgante, M. (2013). A catalog of molecular diversity of *Prunus* germoplasm gathered from aligning NGS reads to the peach reference sequence: Bioinformatic approaches and challenges. *Acta Horticulturae*, 976(3), 169-176.
- Stanys, V., Frercks, B., Siksniene, B., Stepulaitiene, I., Gelvonauskienė, D., Staniene, G., & Bobinas, C. (2012). Identification of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using AFLP and SSR markers. *Žemdirbystė - Agriculture*, 99(4), 437-444.
- Stanys, V., Stanytė, R., Staniėnė, G., & Vinskienė, J. (2008). S-allele identification by PCR analysis in Lithuanian sweet cherries. *Biologija*, 54(1), 22-26.
- Stoeckel, S., Grange, J., Fernández, J., Bilger, I., Frascaria, N., & Marriette, S. (2006). Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species *Prunus avium* L. *Molecular Ecology*, 15(8), 2109-2118.
- Vicedomini, R., Vezzi, F., Scalabrin, S., Arvestad, L., & Policriti, A. (2013). GAM-NGS: genomic assemblies merger for next generation sequencing. *BMC Bioinformatics*, 14(7), 1471-1481.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations, Vol 4. University of Chicago Press. Chicago. 123p.
- Yoon, J., Dongcheng, L., Wonseob, S., Weisheng, L., Aimin, Z., & Shaohua, L. (2006). Genetic diversity and ecogeographical phylogenetic relationships among Peach and Nectarine cultivars based on Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 131(4), 513-521.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

# Micropropagación de plantas de lechosa en recipientes de inmersión temporal a partir de brotes axilares

## Micropropagation of papaya plants in temporary immersion recipients from axillary shoots

*Ariadne Vegas García\**, *Yanet Sandra\*\*†*, *Ohitza González\**, *Andy Díaz\**,  
*José Gerardo Albarran\**, *Alexandra Schmidt\**, *Efraín Salazar\**, *Yris Mujica\**, *Raúl Casado\**,  
*José Fernández\**, *Carlos Marín R\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50718

### Resumen

Se estandarizaron las condiciones de iniciación, multiplicación, enraizamiento y aclimatización de plantas hermafroditas de lechosa cv Maradol provenientes de brotes axilares, producidos en recipientes de inmersión temporal RITA®. En cada envase, contenido de 200 ml de medio de cultivo líquido de Fitch, se colocaron cuatro brotes de 2 a 3 cm de longitud. Los biorreactores se conectaron a tres líneas de inmersión de 5, 2 y 1 min cada 4h y se colocaron 6 envases en promedio por línea, en condiciones de fotoperíodo de 16 h. Transcurridos 30 a 45 días, se cuantificaron los brotes y se clasificaron de acuerdo al tamaño: < 2 cm (pequeños), entre 2 a 3 cm (medianos), > 3 cm con y sin raíz (grandes). Los dos primeros tipos de brotes se continuaron multiplicando en los mismos medios; y los más elongados se aclimatizaron utilizando el Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH). Se determinó la sanidad y la fidelidad de las plantas producidas mediante pruebas de ELISA y RAPD, respectivamente. Durante un periodo de 6 meses se reciclaron un total de 47 recipientes, los cuales produjeron 1.091 brotes: 377 pequeños; 482 medianos; 175 grandes sin raíz y 57 con raíz. Usando el SAH se obtuvo 89,5% de plantas aclimatizadas cuando se usaron brotes enraizados, y 41,6% a partir de brotes sin raíces. Con la combinación de las técnicas RITA y SAH se logró un sistema continuo y eficiente de producción de plantas sanas y fieles al tipo, en comparación con los métodos convencionales de micropropagación y aclimatización.

**Palabras clave:** *Carica papaya*, RITA®, sistema autotrófico, estabilidad genética.

### Abstract

We standardized initiation, multiplication, rooting and acclimatization conditions of papaya cv Maradol hermaphrodite plants from axillary buds produced in temporary immersion reactor RITA®. Recipients contained 200 ml of Fitch liquid culture medium, and four shoots of 2 to 3 cm. in length were placed in each. The bioreactors were connected to three different immersion lines of 5, 2, and 1 min each 4h, with 6 containers per line on average, in 16 h photoperiod. After 30 to 45 days, the shoots produced were quantified and classified according to size: <2 cm (small), from 2 to 3 cm (medium), >3 cm with or without roots (large). The first two types of shoots were multiplied in the same culture media, and more elongated shoots were acclimatized using Autotrophic Hydroponic System (AHS). The sanity and fidelity of the produced plants were determined using ELISA and RAPD, respectively. For a period of six months 47 vessels were recycled and 1,091 shoots were produced: 377 small; 482 medium; 175 large without roots and 57 rooted shoots. Using AHS, 89.5% acclimatized plants were obtained when rooted shoots were used, and 41.6% from rootless shoots. With the combination of RITA and AHS techniques we achieved a continuous and efficient production of healthy and true to type papaya plants, in comparison to conventional micropropagation and acclimatization procedures.

**Key words:** *Carica papaya*, RITA®, autotrophic system, genetic stability.

**Recibido:** mayo 16 de 2014

**Aprobado:** abril 21 de 2015

\* Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Apdo. 4653. Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela. Correos electrónicos: avegas@inia.gob.ve; melanigs@hotmail.com; adlopez@inia.gob.ve; jgalbarran@inia.gob.ve; aschmidt@inia.gob.ve; esalazar@inia.gob.ve; ymujica@inia.gob.ve; casadobatista@yahoo.es; jgfernandez@inia.gob.ve; cmarin@inia.gob.ve

\*\* Estudiante de Maestría, Mención Genética. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela. †04/2012.

## Introducción

La lechosa (*Carica papaya* L.) es uno de los frutales tradicionales de mayor importancia en Venezuela, con una superficie sembrada de 10.614,01 ha y una producción de 199.002 Tm (FAO, 2013). En la actualidad se ha alcanzado un gran avance tecnológico en este rubro y la tendencia es a sustituir los huertos de cultivares criollos de baja tecnología por híbridos del grupo Maradol, dependientes de semillas certificadas importadas, las cuales producen plantas uniformes de menos porte, mayor productividad y calidad de los frutos (Aular y Casares, 2011).

La lechosa se propaga convencionalmente por semillas, sin embargo se han señalado problemas de latencia, los cuales afectan la germinación y conservación a mediano y largo plazo, por lo que la siembra debe efectuarse lo más cercano posible a la época de recolección; solo un porcentaje de las plantas son andromonoicas, con flores hermafroditas, y producen frutos elongados comerciales, y por esta razón se siembran tres plantas por punto; se producen plantas heterogéneas cuando provienen de semillas no seleccionadas e híbridos; además, la sanidad de las semillas debe estar garantizada, ya que algunas enfermedades, como la bacteriosis producida por *Erwinia* sp., se transmiten por esa vía (Guevara et al., 1993; Posada, 2005).

Con protocolos eficientes de micropropagación de cultivares hermafroditas de lechosa se reduciría de 6.000 a 2.000 el número de plantas que se necesitarían para sembrar una hectárea. Ensayos de campo han demostrado que las plantas obtenidas de la micropropagación de yemas resultaron uniformes, conservaron 100% de hermafroditismo y sus frutos elongados, mientras que las plantas de semillas mostraron solo 75% de flores hermafroditas y por lo tanto 25% dieron frutos redondos que son menos comerciales (Talavera et al., 2009). En este frutal, los protocolos de micropropagación precisan ser mejorados para llevarlos a la fase comercial. Se consideran superadas las fases de iniciación a partir de plantas de campo, la elongación y la multiplicación de cultivares, híbridos y plantas transgénicas, particularmente se han logrado coeficientes de multiplicación altos (entre 2,5 hasta 12 veces). Sin embargo, los bajos porcentajes de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de los brotes, y la alta mortalidad de las plántulas obtenidas *in vitro* durante la fase de aclimatización se han señalado como los principales cuellos de botella, y en más de una década se han generado diversos trabajos que abordan estos temas (Chan et al., 2003; Rohman et al., 2007; Talavera et al., 2009).

Adicionalmente, en un esquema de propagación comercial, la presencia de virus en los tejidos *in vitro* iniciales se deberían monitorear. Este aspecto no ha sido abordado en los trabajos revisados sobre micropropagación. Los virus que afectan con frecuencia al cultivo de lechosa son: la Mancha Anillada de la Lechosa (Papaya ringspot virus, PRSV), el Mosaico de la Lechosa

(Papaya mosaic virus, PapMV) y el Mosaico del Pepino (Cucumber mosaic virus, CMV). A fin de detectarlos, el uso de la técnica de inmunodiagnóstico ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), es la estrategia más sencilla, económica y eficaz, ya que estos virus son muy buenos inmunógenos, permitiendo obtener anticuerpos policlonales con muy altos títulos. En el país se han obtenido de manera experimental anticuerpos policlonales específicos contra la proteína de la cápside viral (Marys et al., 2000), sin embargo, existen estuches comerciales de comprobada eficiencia como Agdia®, empleados extensamente en el mundo para el diagnóstico de estos y otros virus.

El desarrollo de sistemas de inmersión temporal (SIT) ha permitido la optimización de la multiplicación de especies vegetales, y la propagación a escala comercial, debido que se reducen los costos operativos mediante el uso de los medios líquidos, de mayor facilidad de manipulación; se disminuyen los tiempos de establecimiento de los explantes iniciales *in vitro*; se aumentan las tasas de multiplicación de los explantes; se obtienen plantas con mayor vigor, en comparación con las formas convencionales de propagación *in vitro* en medios semisólidos o líquido semisumergido o sumergido; las plantas se comportan mejor durante la fase de aclimatización, que el material obtenido de medios semisólidos y líquidos; se posibilita la automatización de algunas de las etapas del cultivo *in vitro*, lo cual reduce el trabajo manual para la producción comercial de plantas (Colmenares y Giménez, 2003; Berthouly y Etienne, 2005; Niemenak et al., 2008). Sin embargo, pueden aparecer anomalías fisiológicas, especialmente la hiperhidricidad, la cual se reduce al exponer los explantes al medio líquido de manera intermitente, por lo que se considera crucial ajustar los tiempos de inmersión, de manera de evitar la expresión de la hiperhidricidad (Berthouly y Etienne, 2005).

Los SIT pueden utilizarse en la propagación masiva de plantas elites, mediante la multiplicación de brotes axilares, microtubérculos y embriones somáticos. Se han señalado experiencias exitosas de micropropagación de frutales, como la uva, *Amelanchier* x *grandifolia*, bananos, plátanos, cítricos, piña, usando diferentes sistemas de inmersión temporal, y algunas de ellas, se producen en escala comercial (Colmenares y Giménez, 2003; Jiménez 2005; Berthouly y Etienne, 2005; Niemenak et al., 2008).

En lechosa, se conocen algunas experiencias previas de micropropagación mediante sistemas de inmersión temporal. Damiano et al. (2003), utilizando el sistema de doble frasco, operado manualmente, obtuvieron mayores tasas de propagación de brotes de lechosa, al compararlo con los cultivos en medio semisólido y líquido estacionario. Posada et al. (2003), emplearon el SIT para la multiplicación y germinación de embriones somáticos de lechosa cv. Maradol Roja, usando sistemas de filtración 'Sartorius' de 250 ml de capa-

cidad. La frecuencia de inmersión fue de tres veces al día durante un minuto. Como resultado fue posible multiplicar los embriones somáticos, logrando coeficientes de multiplicación de 40, en el medio de cultivo suplementado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, transcurridos 45 días, y una germinación del 87%. Existe un estudio anterior sobre cultivos líquidos de embriones somáticos en agitación, para el escalamiento de la producción masiva de plantas de lechosa (Castillo *et al.*, 1998), en el cual se cuantifica y evalúa el potencial de la producción de embriones somáticos, a partir de explantes de hipocotilos de papaya cv. Solo, en medios líquidos en agitación, a 120 rpm. Según esta investigación, se produjeron 455 embriones somáticos por cada 200 mg de callo, en el medio líquido de maduración, después de 112 días, en comparación con 174 en medio solidificado. Según los autores, el uso de un sistema líquido para la producción de embriogénesis secundaria resultó una estrategia más eficiente para la proliferación a gran escala de embriones inmaduros, ya que se requieren periodos de cultivo más cortos para obtener mayores rendimientos. Se indica que el sistema líquido es adecuado para la automatización de la producción rápida de embriones somáticos y la propagación continua en biorreactores.

En cuanto a la estabilidad genética de las plantas micropropagadas, se ha demostrado que son estables, a partir de la proliferación de brotes axilares y meristemas, por sus características morfológicas, agronómicas e industriales y por los análisis citológicos, isoenzimáticos y moleculares, y se considera el sistema más adecuado para la multiplicación clonal de la lechosa (Lopez *et al.*, 2006). Sin embargo se han observado pequeñas diferencias entre plantas micropropagadas y las producidas por semilla, siendo las primeras ligeramente de menor porte y más precoces, lo cual es ventajoso para la cosecha (Fitch *et al.*, 2005, May *et al.*, 2007, Talavera *et al.*, 2009). Por otro lado, cuando se ha utilizado la embriogénesis somática como proceso de micropropagación, se han conseguido variaciones morfológicas tales como, la altura de la planta, número y longitud de flores, al igual que número de frutos, las dimensiones y la forma de los mismos, sobre todo cuando se usaron altas concentraciones de 2,4-D (15 mg.l<sup>-1</sup>), y estas diferencias se pudieron asociar a patrones polimórficos obtenidos en el análisis molecular del ADN usando iniciadores arbitrarios (RAPD) (Homhuan *et al.*, 2008). En otro estudio y con concentraciones bajas de 2,4-D, de 2 mg.l<sup>-1</sup>, hubo un porcentaje alto de variaciones de ploidía, del 14%, en las plantas *in vitro* regeneradas (Clarindo *et al.*, 2008). Las tasas de multiplicación pudieran ser aumentadas significativamente en 20 veces o más al utilizar la embriogénesis somática, pero existe el riesgo de aumentar la variabilidad de las plantas producidas (Posada, 2005; Clarindo *et al.*, 2008; Homhuan *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se estandarizaron las condiciones de iniciación, multiplicación y enraizamiento, de

plantas de lechosa hermafroditas a partir de brotes axilares, en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA<sup>®</sup>); y la aclimatización de las plantas micropropagadas; además se evaluó la estabilidad genética y la sanidad de las mismas, mediante marcadores RAPDs y la técnica de ELISA, respectivamente.

## Materiales y métodos

### ***Micropropagación a partir de brotes axilares de plantas hermafroditas, tipo IV o elongata, del cv. Maradol en recipientes de inmersión temporal***

#### **Siembra de los brotes axilares en los medios líquidos y semisólidos**

**Material vegetal.** Se emplearon brotes axilares de plantas hermafroditas cv. Maradol, obtenidos de cultivos semisólidos, los cuales se colocaron en recipientes de inmersión temporal automatizados RITA<sup>®</sup> (CIRAD, Francia), con 200 ml de medio de cultivo líquido. Los medios estuvieron constituidos por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), complementados con bencil amino purina (BAP) (0,2 mg.l<sup>-1</sup>) y cinetina (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) (Fitch, 1993). Se implantaron cuatro brotes, de 2 a 3 cm de longitud por recipiente, en condiciones asépticas. Los recipientes se conectaron a tres líneas, con los siguientes tiempos de inmersión: línea 1: 5 min.4h<sup>-1</sup>; línea 2: 2 min.4h<sup>-1</sup>; línea 3: 1 min.4h<sup>-1</sup> y se colocaron 6 envases en promedio por línea, en condiciones de fotoperíodo de 16 h de iluminación diaria, a una intensidad de 32  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  de luz fluorescente blanca, una temperatura entre 23,2 y 25°C, y HR entre 50,9 a 55,4%. Transcurridos entre 30 a 45 días, se cuantificaron los brotes nuevos enraizados o sin raíz obtenidos y se clasificaron de acuerdo al tamaño, por un período de seis meses. Los brotes menores de 2 a 3 cm se continuaron multiplicando en los mismos medios de cultivo; los brotes elongados >3 cm enraizados o sin raíz se aclimatizaron utilizando el Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) (Rigato *et al.*, 2001). Además se calculó la tasa de proliferación de las líneas de producción (número de brotes producidos - número de brotes sembrados/número de brotes sembrados).

En el caso de las siembras en cultivo semisólidos, se utilizaron envases de vidrio de 200 ml, contentivos de 30 ml de medio Fitch (1993), solidificado con agar a 7g.l<sup>-1</sup>, en los cuales se implantaron 4 brotes medianos, de 2 a 3 cm de longitud, en un total de 15 frascos, y se reciclaron transcurridos entre 30 a 45 días. Los frascos sembrados permanecieron a las mismas condiciones de luz y temperatura especificadas anteriormente. Este ensayo se repitió una vez. Se calculó la tasa de proliferación de los brotes en los medios semisólidos como se mencionó en el párrafo anterior.

Se elaboró una matriz de datos categorizados por línea y mes con las variables: número de envases sem-

brados, número de envases cosechados, tipos de brotes, número de brotes, número de brotes contaminados con bacterias y hongos. La matriz fue tabulada en la hoja de cálculo Microsoft® Excel 2007 y exportada a la aplicación Infostat v. 1.0/P (InfoStat, 2002). Los datos fueron modelados bajo un arreglo factorial 3x4 (Número de líneas x Tipos de brotes) con 4 repeticiones, bajo un diseño totalmente aleatorizado, para cada mes de producción. Además, se analizó el conjunto de la producción a los seis meses mediante un análisis de la varianza combinado en el tiempo (mes, línea y tipo de brote). Previamente fueron probados exitosamente los supuestos de normalidad para ambos modelos Infostat (InfoStat, 2002). Para el análisis de la interacción Línea x Tipo de brote, se empleó la prueba de Ji al cuadrado a un nivel de  $p=0,05$ . El análisis factorial de Correspondencias Múltiples fue empleado para observar los patrones de asociación entre las tres líneas de producción y los cuatro tipos de brote (Agresti, 1990; Greenacre y Hastie, 1987).

**Aclimatización:** Se utilizaron dos métodos para la aclimatización de los brotes.

**Método convencional:** Se aclimatizaron 304 brotes enraizados o no, procedentes de los RITA®, usando el procedimiento convencional: Se preparó una mezcla de sustrato comercial Sunshine® N°5 y tierra cernida en proporción 3:2, luego se esterilizó y se llenaron vasos plásticos de 270 ml previamente perforados. Los brotes con raíces se lavaron con suficiente agua destilada para eliminar completamente el agar, tomando la precaución de no dañar las mismas. Los brotes sin raíz fueron tratados con una solución de AIB a  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  (Posada, 2005). Los brotes fueron transplantados individualmente en los vasos plásticos, y se cubrieron con otro vaso transparente, de menor capacidad, con la finalidad de crear una cámara húmeda con un microclima adecuado para su adaptación. Se regaron con una solución compuesta por sales MS al 50%, cada dos a tres días. A partir de la segunda semana, se retiraron progresivamente los vasos que cubrían las plantas hasta lograr la aclimatización de la misma. Posteriormente se transplantaron a bolsas negras o materos.

**Sistema de aclimatización hidropónico (SAH):** Se sembraron 24 brotes enraizados, y 24 brotes sin raíz, cada tipo separadamente, en cajas plásticas transparentes desechables de 32 x 25 cm, conteniendo sustrato comercial Sunshine® N°5, al cual previamente se le aplicó una solución compuesta por sales MS al 50%, en una proporción 1:1 (peso/volumen). En las cajas se aplicó 400g de sustrato y el riego se realizó una vez por semana con la solución antes mencionada. Esta experiencia se repitió una vez.

En ambos métodos los brotes transplantados se mantuvieron en una temperatura de 23,2 a 25°C y una

humedad relativa de 50,9 al 55,4%, en cámaras de crecimiento con 16 h de iluminación diaria.

Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatización (número de brotes enraizados aclimatizados/número de brotes sembrados x 100). Se aplicó una prueba binomial a los porcentajes de sobrevivencia obtenidos. Las plantas estuvieron aptas para la siembra en campo en un periodo de tres a cuatro meses y fueron transplantadas en cuatro áreas diferentes del estado Aragua, en donde fueron evaluadas morfológicamente (datos no mostrados).

### ***Extracción y amplificación de ADN de lechosa por RAPD***

Se muestrearon 20 brotes tomados al azar de los RITA®, en las líneas de producción. Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta modificado por CIAT (1999), a partir de tejido foliar.

Una vez extraído el ADN genómico se verificó su calidad y concentración. Los 20 iniciadores utilizados fueron las veinte secuencias de la serie OPA de Operon technologies, según el protocolo de Chen *et al.* (2011). La visualización y análisis se realizó con el equipo Chemi -Doc Bio Rad, Software Quantity One Versión 4-2. Los productos RAPD se compararon con el patrón de peso molecular del ADN del fago Lambda digerido con BST E2.

### ***Aplicación de las pruebas diagnóstico de virus fitopatógenos en las plantas regeneradas***

Se usaron hojas de los brotes de lechosa cv. Maradol provenientes de la propagación masiva en los RITA®, para la detección de los virus fitopatógenos. Se tomaron cuatro muestras aleatorias de los brotes multiplicados en las tres líneas de inmersión.

La técnica de diagnóstico que se utilizó fue los inmunoensayos ELISA directos con doble capa de anticuerpos policlonales y anticuerpo de detección conjugado con fosfatasa alcalina, de la casa comercial AGDIA®, los cuales fueron diseñados específicamente para detección de los virus que afectan más frecuentemente a la lechosa, tales como, la Mancha Anillada de la Lechosa (Papaya ringspot virus, PRSV), el Mosaico de la Lechosa (Papaya Mosaic Virus, PapMV) y el Mosaico del Pepino (Cucumber mosaic virus, CMV). Se usó el protocolo descrito por Noa-Carrazana *et al.* (2007) para su aplicación. Se incluyeron testigos negativos o sanos y positivos (suministrados con el estuche y disponibles en el laboratorio). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405 nm, para medir absorbancia con un espectrofotómetro o lector de placas de ELISA, marca LAB SYSTEM, modelo MultiSkan EX. Para el cálculo del punto de corte se utilizó el doble del valor del promedio de absorbancia del testigo sano.

## Resultados y discusión

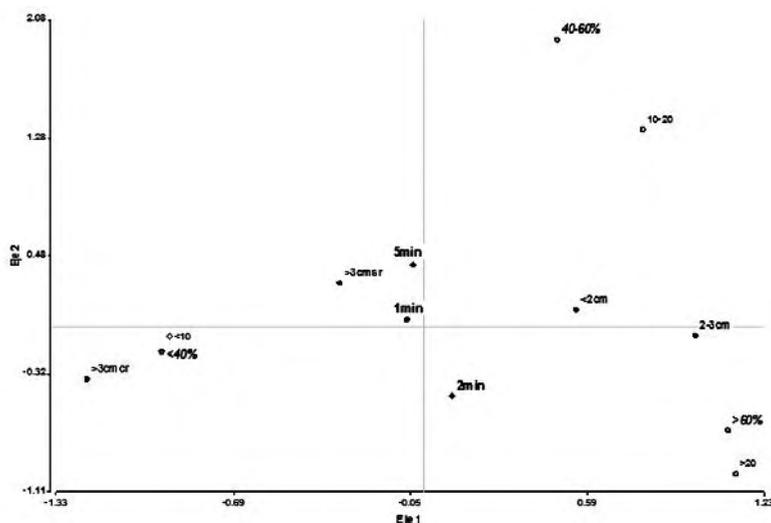
### **Micropropagación a partir de brotes axilares de plantas de lechosa hermafroditas, tipo IV o elongata cv. Maradol en recipientes de inmersión temporal**

Durante un período de seis meses se cosechó un total de 47 recipientes, en las tres líneas, con diferentes tiempos de inmersión, los cuales produjeron un total de 1.091 brotes. Se produjo un promedio mensual de 182 brotes, en 6 envases cosechados por mes, como promedio. El rango de brotes cosechados por mes fluctuó, entre 68 y 298, al igual que los envases cosechados, los cuales estuvieron entre 4 a 12.

Los brotes producidos fueron clasificados de la siguiente manera: 377 brotes pequeños (<2 cm), 482 brotes medianos (2 a 3 cm), 175 brotes grandes (mayores de 3 cm) sin raíz y 57 brotes grandes con raíz. La mayoría de los brotes fueron de tamaño mediano, cercano a la mitad de los brotes producidos (44,18%), y sirvieron para ser reciclados y multiplicados en los RITA®; los brotes grandes, enraizados y sin raíces, representaron el 21,26%, y se aclimatizaron directamente. Por otro lado, los brotes pequeños (34,56%), se colocaron en medios semisólidos Fitch (1993), para su mantenimiento y desarrollo. Según el ANAVAR no hubo diferencias significativas con respecto al número total de brotes

producidos en las tres líneas de inmersión evaluadas, sin embargo se observó que difieren en cuanto al tipo de brotes producidos: en las frecuencias de 1 y 2 min se produjo la mayor cantidad de brotes de tamaño <2 cm; en la frecuencia de 5 min. 4h<sup>-1</sup> fue mayor la proliferación de brotes de 2-3 cm; así mismo los brotes mayores de 3 cm, con y sin raíz se produjeron predominantemente en la línea con una frecuencia de riego de 2min.4h<sup>-1</sup>. De esta manera, en las líneas de 1 y 5 min.4h<sup>-1</sup> se produjo una mayor cantidad de brotes pequeños y medianos, y la frecuencia de 2 min.4h<sup>-1</sup> sirvió para la producción de los cuatro tipos de brotes, incluyendo los elongados, enraizados o sin raíz, aptos para la fase *ex vitro* (tabla I). Lo descrito anteriormente se puede visualizar en el análisis de correspondencia múltiple entre el tipo de brote y la frecuencia de inmersión (figura 1). En general, hubo fluctuaciones en el número promedio de brotes/mes, en las líneas de producción, con una mayor cantidad de brotes en los primeros tres meses y en el mes 6 (Datos no mostrados).

De acuerdo a los resultados anteriores, las tasas de proliferación se calcularon en 5,3, 6,0 y 5,9 veces, para las líneas 1, 2 y 3, respectivamente, y la tasa de proliferación promedio de 5,7. En los resultados de Damiano *et al.* (2003), esta tasa fue significativamente más alta, de hasta  $24 \pm 3,32$  para brotes de lechosa micropropagados en el SIT de doble frasco, con un período de



**Figura 1.** Análisis de correspondencias múltiples entre las tres frecuencias de inmersión (1, 2 y 5 min cada 4h) y los tipos de brotes de lechosa producidos en los RITA, a los seis meses de la micropropagación.

Contribución a la prueba Ji cuadrado

|   | Autovalor | Inercias | Ji cuadrado | (%)   | % acumulado |
|---|-----------|----------|-------------|-------|-------------|
| 1 | 0,80      | 0,63     | 272,20      | 28,10 | 28,10       |
| 2 | 0,65      | 0,42     | 179,20      | 18,50 | 46,60       |

**Tabla 1.** Número acumulado de acuerdo al tipo de brote de lechosa cv Maradol producido en los RITA®, usando tres líneas de frecuencias de inmersión, a los seis meses de la micropropagación.

| Línea de inmersión<br>(min cada 4h) | Tipo de brote |       |               |                 | Total general |
|-------------------------------------|---------------|-------|---------------|-----------------|---------------|
|                                     | <2cm          | 2-3cm | >3cm sin raíz | >3cm enraizados |               |
| 1                                   | 151           | 164   | 47            | 18              | 380           |
| 2                                   | 137           | 143   | 68            | 21              | 369           |
| 5                                   | 89            | 175   | 60            | 18              | 342           |
| Total                               | 377           | 482   | 175           | 57              | 1091          |

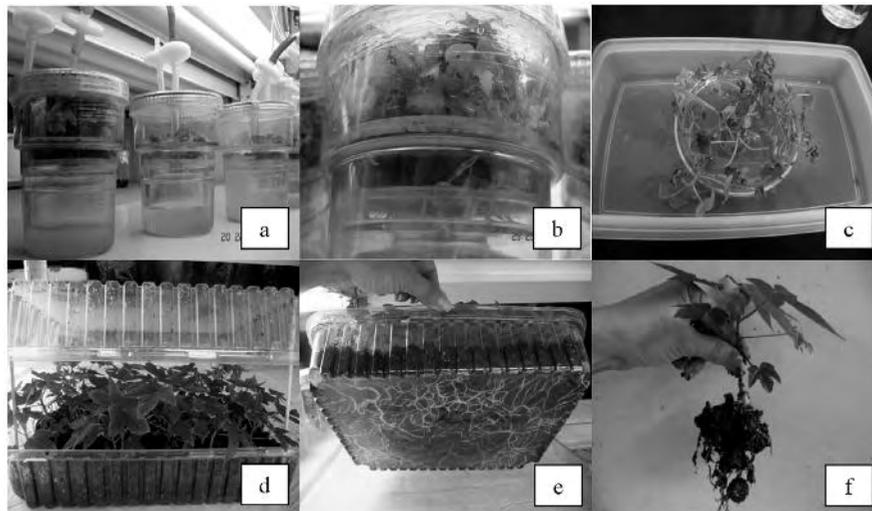
Ji Cuadrado Pearson 22,51 6 p: 0,0010  
 Ji Cuadrado MV-G2 23,16 6 p: 0,0007  
 Coef.Conting.Cramer 0,08  
 Coef.Conting.Pearson 0,14

inmersión de 60 min/día, en medio de multiplicación MS con 0,15 y 0,015 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y AIB, respectivamente, en comparación con los testigos en medios semisólidos, y hubo inhibición en la multiplicación de los brotes, en los cultivos líquidos estáticos. Sin embargo, los brotes proliferados se mostraron poco elongados y difíciles de separar para la siguiente etapa de enraizamiento *in vitro*, la cual no fue abordada en ese trabajo.

Las tasas de proliferación encontradas en la presente investigación fueron similares, a las obtenidas en café (*C. arabica* y *C. canephora*), durante la multiplicación de micro esquejes (Berthouly y Etienne, 2005) y en brotes de banano (Alvard *et al.*, 1993), con tiempos de inmersión de 20 min.2h<sup>-1</sup>, con este mismo sistema. Sin embargo, Colmenares y Giménez (2003), lograron

tasas mucho más altas, trabajando con varias especies de musáceas, 8,4 para banano cv. Williams y 11,2 para plátano Hartón, con tiempos de inmersión de 20 min.4h<sup>-1</sup>.

Los brotes producidos por la proliferación de las yemas axilares de lechosa cv. Maradol, en los RITA®, formaron macollas, alrededor de los brotes iniciales y fueron más alargados que los de los medios semisólidos. Por otro lado, debido al empobrecimiento de los medios líquidos, después de los 30 días en cultivo, hubo senescencia de las hojas y se indujo el enraizamiento de algunos de los brotes. Las raíces producidas tuvieron un aspecto normal fibroso, sin formación de callo en la base (figura 2 b).



**Figura 2.** Proceso de micropropagación de plantas de lechosa cultivar Maradol a partir de brotes en los RITA® y aclimatización mediante el sistema autotrófico hidropónico (SAH). a) RITA mostrando el crecimiento de los brotes en condiciones controladas; b) detalle de la producción de brotes y plántulas en uno de los envases; c) aspecto de los brotes sin raíces, provenientes de los RITA, tratados con AIB; d) Endurecimiento paulatino de las plantas, después de los 26 días del trasplante, en el sistema autotrófico hidropónico (SAH); e) Detalle del desarrollo de las raíces de las plantas; f) Desarrollo de las plantas aclimatizadas, 26 días después del trasplante en el SAH.

Con la micropropagación de brotes de lechosa en los RITA® no hubo necesidad de la aplicación de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) para la elongación de los brotes, ni de auxinas para la inducción de raíces, como ha sido recomendado por varios autores (Drew et al., 1991; Solis et al., 2011). Este proceso hace innecesarios los cambios a diferentes medios de cultivo, hecho que disminuye los costos operacionales de elaboración y la manipulación, además que acorta los tiempos de producción de plantas completas.

En este estudio, las tasas de multiplicación obtenidas en el sistema RITA® y el vigor de las plantas fue mayor, más del doble, en comparación con la estimada de 2 a 2,5, en el sistema convencional semisólido, cada 30 a 45 días. En este último caso, los brotes fueron más pequeños y rara vez enraizaban en el medio de multiplicación. Algunos autores han reportado tasas de proliferación similares de 3,42 (Solis et al., 2011), sin embargo, otros autores han obtenido tasas mucho mayores de 7,50, 9,87, 12,73 veces (Lai et al., 2003; Gallardo, 2002; Rohman et al., 2007), en medios semisólidos.

En la presente investigación, la aparición de brotes hiperhídricos fue baja (plantas de 3 envases de los 47 cosechados), lo que representó el apenas 6% de los envases utilizados. De igual manera, Damiano et al.(2003) y Posada et al.(2003), no encontraron problemas de hiperhidricidad en los brotes o embriones somáticos micropropagados.

El porcentaje de contaminación fue bajo (12,5%), en los primeros 2 meses, predominantemente de origen bacteriano (5%), posiblemente debido a contaminación endógena de los tejidos, la cual no fue percibida en los medios semisólidos. Varios autores han señalado la presencia de bacterias endógenas, no fitopatógenas, en el cultivo *in vitro* de lechosa (Posada, 2005), este problema fue fácilmente detectable en los medios líquidos, lo cual hizo que los brotes contaminados fueran descartados al inicio de la micropropagación; y durante la producción de brotes en los meses 2, 5 y 6,

hubo una baja contaminación por hongos (7%), debido posiblemente a contaminación del ambiente.

### **Aclimatización de brotes y las plantas de lechosa**

Utilizando el método convencional se lograron porcentajes de sobrevivencia bajos: 40,9% y 49,0%, utilizando brotes > 3 cm enraizados o no, respectivamente, y no hubo diferencias significativas entre los resultados (tabla 2).

Utilizando el SAH, se incrementó el porcentaje de plantas aclimatizadas, lográndose un 89,5% cuando se usaron brotes de >3 cm enraizados *in vitro*, sin embargo fue bajo cuando se aclimatizaron brotes sin raíz, y hubo diferencias significativas entre estos porcentajes (tabla 2).

La sobrevivencia *in vivo* durante la aclimatización fue mayor con los brotes enraizados *in vitro*, en comparación los resultados logrados por otros autores, los cuales oscilan entre 65 y 85%, (Posada, 2005; Tetsushi et al., 2008; Anandan et al., 2011). Aproximadamente a los 26 días, las plantas se mostraron muy vigorosas, presentaron abundantes raíces fibrosas, y estuvieron aptas para el trasplante a macetas (figura 2 d, e, f). Cuando se usaron los brotes sin raíces se observó la aparición de raíces en algunas de las plantas, a los 30 días de transplantadas en el sustrato, y hubo que esperar 30 días más para que estuvieran aptas para el trasplante a macetas. En la fase de aclimatización pareció necesario la presencia de raíces para una mayor sobrevivencia en el sustrato estéril, tal como ha sido señalado por otros autores, quienes han observado que si bien las raíces no son del todo funcionales debido a la escasez de pelos absorbentes, un mayor tamaño y número de raíces inducen la formación *ex vitro* de nuevas raíces y pelos absorbentes, que extraerán del suelo los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plántulas (Solis et al., 2011).

Las bandejas tuvieron ventajas con respecto al uso de vasos individuales, en cuanto a que implicó una mayor facilidad en el manejo de los lotes de plantas en un

**Tabla 2.** Porcentajes de sobrevivencia de los brotes con o sin raíces aclimatizados de lechosa cv Maradol, producido en los RITA®.

| Método de aclimatización utilizado | Método Convencional (%) | Método SAH (%) |
|------------------------------------|-------------------------|----------------|
| Brotes >3cm sin raíz               | 40,9                    | 41,6           |
| Brotes >3 cm enraizados            | 49,0                    | 89,5           |
| Promedios                          | 44,95                   | 65,55          |

**Método convencional:** brotes aclimatizados en vasos plásticos, conteniendo una mezcla de sustrato comercial Sunshine® N°5 y tierra cernida.

**Método SAH:** aclimatizados en bandejas, de 32 x 25 cm, conteniendo sustrato comercial Sunshine® N°5.

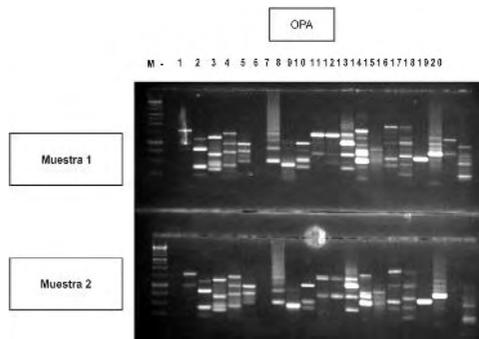
Solo hubo diferencias significativas entre los porcentajes de sobrevivencia de los brotes enraizados *in vitro*, aclimatizados usando en método SAH, con respecto los demás tratamientos.

Considerando ambos métodos, el convencional tiene menor porcentaje de sobrevivencia a un nivel de  $p < 0,01$

mismo envase para la aplicación de riego semanal y el control de la humedad, y por su peso ligero estas bandejas pueden ser enviadas y distribuidas a los productores. Las plantas estuvieron aptas para la siembra en campo en un periodo de tres a cuatro meses y fueron morfológicamente normales y de sexo hermafrodita (datos no mostrados).

### **Amplificación de ADN de brotes de lechosa cv. Maradol hermafrodita por RAPD, producidos en los RITA**

Los resultados indicaron que no hubo diferencias entre los patrones de fragmentos amplificados en las 20 muestras analizadas, provenientes de los RITA®, ya que los fragmentos se distribuyeron de manera similar para los 20 iniciadores utilizados, demostrando la uniformidad genética de los brotes micropropagados. Estos resultados, garantizaron la fidelidad de las plantas producidas, a partir de la multiplicación de yemas axilares (figura 3). Resultados similares fueron obtenidos por López *et al.*, (2006), micropropagando el mismo cultivar, a partir de segmentos nodales, y utilizando marcadores AFLP, además de las características morfológicas de las plantas en campo.



**Figura 3.** ADN amplificado de dos muestras foliares de las vitroplantas cultivar Maradol con 20 iniciadores OPERON®, mostrando fragmentos similares amplificados. En el primer carril se muestra el patrón de peso molecular del ADN del fago Lambda digerido con BST E2, y en los carriles 1 al 20, los fragmentos amplificados con los iniciadores.

### **Pruebas diagnóstico de enfermedades virales en los brotes de lechosa cv. Maradol hermafrodita, producidos en los RITA**

Las muestras foliares analizadas de los brotes micropropagados resultaron negativas para los virus de la Mancha Anillada de la Lechosa (Papaya ringspot virus, PRSV), el Mosaico de la Lechosa (Papaya Mosaic Virus, PapMV) y el Mosaico del Pepino (Cucumber mosaic virus, CMV), dando lecturas similares o menores a los testigos negativos para cada prueba, entre 0,0 a 0,03, mientras los testigos positivos dieron 3,08, 2,6 y 2,1, respectivamente. Estos análisis garantizaron la sanidad de dichos brotes.

## **Conclusiones**

En este trabajo se logró un sistema continuo de producción de plantas de lechosa cv. Maradol hermafroditas, tipo elongata, sanas y fieles al tipo, mediante la estandarización de los procedimientos de iniciación, multiplicación, enraizamiento y aclimatización de plantas producidas con el sistema RITA, a partir de brotes axilares *in vitro*. Se demostró que el sistema de inmersión temporal fue más eficiente, ya que se aumentó la tasa de multiplicación a un promedio de 5,7, en comparación al método convencional, en medios semisólidos, bajo las mismas condiciones ambientales. Los brotes no fueron sensibles al medio líquido, en las frecuencias de inmersión utilizadas.

Líneas con frecuencias de inmersión de 1 o 5 min.4h-1 producen brotes pequeños y medianos, y la frecuencia de 2 min.4-1h sirvió para la multiplicación de los cuatro tipos de brotes, incluyendo los elongados aptos para aclimatización o fase *ex vitro*.

La utilización del SAH con brotes enraizados *in vitro*, incrementó la eficiencia en el proceso de aclimatización de plantas, ya que mejoró el porcentaje de sobrevivencia y facilitó el manejo de las mismas.

La aplicación de las dos técnicas conjuntas SIT y SAH fueron las más eficientes para la multiplicación y aclimatización de plantas.

Con las pruebas moleculares e inmunológicas se garantizó la estabilidad genética y la sanidad, respectivamente, de las plantas producidas, a través de este proceso de micropropagación.

## **Agradecimientos**

A través del proyecto: “Desarrollo de un Referencial Tecnológico para la Producción Masiva de Frutales Requeridos por la Industria mediante Sistemas de Bio-reactores de Inmersión Temporal” (FCI 09PS38-05) fue posible adaptar y optimizar un sistema de propagación asexual masiva. Con el proyecto “Mejoramiento genético de la lechosa en zonas productoras de la región Central, mediante técnicas convencionales y biotecnológicas” (Código 10-03-02-01) financiado por el Plan Nacional de Semilla del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, se reactivó este sistema de propagación con la finalidad de producir plantas madres para la obtención de semilla de buena calidad, se mejoró la aclimatización y se realizaron los ensayos de campo.

## **Referencias bibliográficas**

- Alvard, D., Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation. *Plant Cell Tiss Org.* 32, 55-56.
- Agresti, A. (1990). *Categorical Data Analysis.* John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Anandan, R., Thirugnanakumar, S., Sudhakar, D., Balasubramanian, P. (2011). *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of

- Carica papaya* L. *Journal of Agricultural Technology*, 7, 1339-1348.
- Aular, J., Casares, M. (2011). Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 187-198.
- Berthouly, M., Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid Culture for in vitro Plant Propagation*. A.K. Hvoslef-Eide, W. Preil (eds). pp 165-195.
- Chen, P., Salazar, E., Fernández, H., Castro, L., Russo, A., Vásquez, S. (2011). Detección de polimorfismos RAPD en materiales de *Musa* sp. con respuesta diferencial al ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Agron. Tropic*, 61, 125-132.
- CIAT. (1999). Protocolos para marcadores moleculares. González, D., Palacios, N., Gallego, G., Tohme, J. (comps y eds.). 82 p.
- Castillo, B., Smith, M., Yadava, U. (1998). Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. *J. Horticultural Science and Biotechnology*, 73, 307-311.
- Clarindo, W., Carvahlo, C., Santos, F., Abreu, I., Campos, W. (2008). Recovery polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, 92, 207-214.
- Damiano, C., Monticelli, S., La Starza, S. R., Gentile, A., Frattarelli, A. (2002, August). Temperate fruit plant propagation through temporary immersion. In *XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations* pp. 193-200.
- Drew, R., Simpson, B., Osborne, W. (1991). Degradation of exogenous indole-3-butyric acid and riboflavin and their influence on rooting response of papaya *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26, 29-34.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production. (2013). Disponible en: [faostat3.fao.org/download/Q/QC/E](http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E).
- Fitch, M. (1993). High-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 205-212.
- Fitch, M., Leong, T., Akashi, L., Yeh, A., White, S., De la Cruz, A., Santo, L., Ferreira, S., Moore, P. (2005). Growth and yield of clonally propagated and seedling-derived papayas. i. growth. ii. yield. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 40, 1283-1290.
- Gallardo, J., Posada, L., Gómez, R. (2002). Micropropagación del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. *Bioteecnología Vegetal*, 2, 211-215.
- Greenacre, M., Hastie, T. (1987). The Geometric Interpretation of Correspondence Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 82, 437-447.
- Guevara, Y., Rondón, A., Maselli, A., Salcedo, F., Betancourt, J. (1993). Marchitez bacteriana del lechoso *Carica papaya* L. en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 43, 107-116.
- Homhuan, S., Kijwijan, B., Wangosomnuk, P., Bodhipadma, K. (2008). Variation of plant derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. *Science Asia*, 34, 347-352.
- InfoStat (2002). InfoStat, versión 1.1. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
- Jiménez, E. (1995). Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. In: *Liquid Culture for in vitro plant propagation*. A.K. Hvoslef-Eide, W. Preil (eds). pp.165-195.
- Lai, C., Dewi, P., Su, T., Lee, W. (2003). Rooting and acclimatization of micropropagated tropical fruits trees. Proc. 1<sup>st</sup> IS on Acclim. and Establ. of Micropropagated Plants. *Acta Hort*, 616 (ISHS), 199-206.
- López, A., Ardisana, E., Cornide, M., Coto, O., Vargas, D., Arencibia, A. (2006). Estabilidad genética de plantas de papaya (*Carica papaya* L., cv Maradol Roja) propagadas *in vitro*. *Revista Innovación tecnológica*, Septiembre 2006 Vol. 12 No 3. ISSN 1025-6504 — RNPS 1813 Disponible en: <http://innovacion.lastunas.cu/Vol12No3/No.3.htm>
- Marys, E., Carballo, J., Izaguirre-Mayoral, M. (2000). Occurrence and relatives incidences of viruses infecting papaya in Venezuela. *Annals Applied Biology*, 136, 121-134.
- May, C., Gil, F., Contreras, F., Santamaría, J. (2007). Field performance of 100% hermaphrodite micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae*, 1, 219-222.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Omokolo, D., Lieberei, R. (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Report*, 27, 667-676.
- Noa-Carranza, J., Gonzalez-de-León, D., Silva-Rosalez, L. (2007). Molecular of severe isolates of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus Genes*, 35, 109-117.
- Posada, L., Gómez, R., Reyes, M. (2003). Empleo Sistemas de Inmersión Temporal en la multiplicación y germinación de embriones somáticos de banano cultivar Gran Enano (AAA) y papaya var. Maradol Rojo. *Bioteecnología Vegetal*, 3, 143 - 147.
- Posada, L. (2005). Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Bioteecnología Vegetal*, 5, 67-79.
- Rigato, S., González, A., Huarte, M. (2001). Producción de plántulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponía para la obtención de semilla prebásica. *Revista Latinoamericana de la papa*, 12, 110-120.
- Rohman, M., Islam, N., Alam, S., Rashid, M., Kumar, T. (2007). Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya*) for clonal propagation. *Biotechnology*, 6, 339-343.
- Solis, R., Olivera, J., La Rosa, R. (2011). Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. *Rev. Peru. Biol.*, 18, 343-347.
- Talavera, C., Espadas, F., Contreras, F., Fuentes, G., Santamaría, J. (2009). Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. In, *Proc. III<sup>rd</sup> IS on Acclim. and Establ. of Micropropagated Plants*. *Acta Hort (ISHS)*, 812, 373-378.
- Tetsushi, H., Sadao, K., Masahiko, Y., Hiroshi, F. (2008). Mass-production of papaya (*Carica papaya* L.) saplings using shoot-tip culture for commercial use. *South Pacific Studies*, 28, 87-95.

# Diseño mecánico de un exoesqueleto para rehabilitación de miembro superior

## Mechanical design of an exoskeleton for upper limb rehabilitation

*Juan Francisco Ayala-Lozano\**, *Guillermo Urriolagoitia-Sosa\**, *Beatriz Romero-Angeles\*\**,  
*Christopher René Torres-San Miguel\**, *Luis Antonio Aguilar-Pérez\**,  
*Guillermo Manuel Urriolagoitia-Calderón\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.44188

### Resumen

El ritmo de vida actual, tanto sociocultural como tecnológico, ha desembocado en un aumento de enfermedades y padecimientos que afectan las capacidades físico-motrices de los individuos. Esto ha originado el desarrollo de prototipos para auxiliar al paciente a recuperar la movilidad y la fortaleza de las extremidades superiores afectadas. El presente trabajo aborda el diseño de una estructura mecánica de un exoesqueleto con 4 grados de libertad para miembro superior. La cual tiene como principales atributos la capacidad de ajustarse a la antropometría del paciente mexicano (longitud del brazo, extensión del antebrazo, condiciones geométricas de la espalda y altura del paciente). Se aplicó el método BLITZ QFD para obtener el diseño conceptual óptimo y establecer adecuadamente las condiciones de carga de servicio. Por lo que, se definieron 5 casos de estudio cuasi-estáticos e implantaron condiciones para rehabilitación de los pacientes. Asimismo, mediante el Método de Elemento Finito (MEF) se analizaron los esfuerzos y deformaciones a los que la estructura está sometida durante la aplicación de los agentes externos de servicio. Los resultados presentados en éste trabajo exhiben una nueva propuesta para la rehabilitación de pacientes con problemas de movilidad en miembro superior. Donde el equipo propuesto permite la rehabilitación del miembro superior apoyado en 4 grados de libertad (tres grados de libertad en el hombro y uno en el codo), el cual es adecuado para realizar terapias activas y pasivas. Asimismo, es un dispositivo que está al alcance de un mayor porcentaje de la población por su bajo costo y fácil desarrollo en la fabricación.

**Palabras clave:** MEF, Blitz QFD, exoesqueletos, diseño mecánico.

### Abstract

The pace of modern life, both socio-cultural and technologically, has led to an increase of diseases and conditions that affect the physical-motor capabilities of persons. This increase has originated the development of prototypes to help patients to regain mobility and strength of the affected upper limb. This work, deals with the mechanical structure design of an exoskeleton with 4 degrees freedom for upper limb. Which has the capacity to adjust to the Mexican patient anthropometry (arm length, forearm extension, geometry conditions of the back and the patient's height) BLITZ QFD method was applied to establish the conceptual design and loading service conditions on the structure. So, 5 quasi-static cases of study were defined and conditions for patient rehabilitation were subjected. Also by applying the finite element method the structure was analyzed due to service loading. The results presented in this work, show a new method for patient rehabilitation with mobility deficiencies in the upper limb. The proposed new design allows the rehabilitation of the upper limb under 4 degrees of freedom (tree degrees of freedom at shoulder and one at the elbow), which is perfect to perform active and passive therapy. Additionally, it is an equipment of low cost, which can be affordable to almost all the country population.

**Key words:** FEM, Blitz QFD, exoskeletons, mechanical design

**Recibido:** agosto 20 de 2014

**Aprobado:** marzo 26 de 2015

\* Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrados e Investigación, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos" Zacatenco, Edificio 5 Segundo piso, Col. Lindavista, CP 07738, México, D. F., México.

\*\* Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Unidad Azcapotzalco, Av. de las Granjas No. 682, Col. Santa Catarina, CP 02250, México, D. F., México.  
e-mail: jayalal1300@alumno.ipn.mx, urrio332@hotmail.com, romerobeatriz97@hotmail.com, ctorress@ipn.mx, laguilarp0600@egresado.ipn.mx, guiurri@hotmail.com.

## Introducción

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) constituyen un problema de salud mundial, las cuales tienen tendencia creciente. Según datos de la *Organización Mundial de la Salud* (OMS), la ECV es una de las más importantes causas de discapacidad y afecta seriamente la calidad de vida del individuo, siendo su espectro de afectaciones muy amplio. Así mismo, se asocia con problemas emocionales y depresión (Secretaría de Salud, 2009). Las secuelas por ECV pueden ser sensitivas o motoras, siendo estas últimas las que generan un mayor grado de invalidez. Entre los pacientes mexicanos que presentan secuelas motoras, se encontró que el 81% de los hemipléjicos sufren alguna complicación. Las más frecuentes son depresión, hombro doloroso y contracturas osteoarticulares (Cabrero-Rayo *et al.*, 2008).

La rehabilitación del paciente adulto con ECV es un proceso dirigido a lograr un nivel funcional, físico y social, dirigido a facilitar su independencia y la reintegración al entorno familiar, social y laboral (Secretaría de Salud, 1992). La rehabilitación física se puede dividir principalmente en dos tipos:

1. Activa.- El paciente es el encargado de mover su extremidad.
2. Pasiva.- El fisioterapeuta origina el accionar de la extremidad del paciente.

El uso de robots y/o exoesqueletos en rehabilitación tiene dos aplicaciones fundamentales (Sabater *et al.*, 2007):

- Durante movimientos activos del paciente, el robot almacena información de la realización del movimiento (posición, velocidad y fuerza, entre otros), con la cual se pueden ver los avances y optimizar las rutinas de ejercitación.
- Asimismo, se pueden provocar movimientos pasivos o resistivos de la extremidad del paciente la cual es sujeta por el robot, sustituyendo en éste caso al fisioterapeuta.

Los dispositivos utilizados para rehabilitación de la extremidad superior se clasifican principalmente en 2 grupos; exoesqueletos y efectores finales (Rodríguez-Prunotto *et al.*, 2014). Un exoesqueleto, se define como un sistema biomecánico, donde el mecanismo se encuentra adaptado a la estructura física del cuerpo humano. Con un control que puede estar conectado a las mismas señales del cerebro. Con actuadores que vía analógica generan o reproducen las funciones del cuerpo. Actuando como un sólo sistema integrado que puede desarrollar actividades variadas (Pons, 2008).

Como las principales contribuciones en esta rama de la tecnología, se tiene que en el año 1992 se diseñó *MIT-MANUS* que es un exoesqueleto utilizado para generar

rutinas de terapia física y ocupacional. Realiza actividades visuales y auditivas con extensión táctil, propioceptiva y kinestésica. Ejecuta rutinas de rehabilitación y tiene ambiente virtual. El mecanismo es de 5 grados de libertad (GdL) montado en un paralelogramo manejado por caja de engranes (Hogan, 1992). Para el 2003 aparece un exoesqueleto de 7 GdL *Soft-Actuated*, capaz de generar movimientos de flexo-extensión, abducción-aducción y rotación interna-externa del hombro, flexo-extensión del codo, prono-supinación del antebrazo, flexo-extensión y desviación radio-ulnar de la muñeca. La característica original es el uso de músculos neumáticos como un par antagonico. Posee una masa ligera y una excelente proporción fuerza-peso (Tsagarakis y Caldwell, 2003). Así como en el 2004, el dispositivo *ASSIST (Active Support Splint)* es un exoesqueleto de un grado de libertad que es impulsado por actuadores neumáticos suaves. Fueron desarrolladas dos variantes de este sistema. Uno con la finalidad de aumentar el rango de movimiento y el segundo con la finalidad de aumentar la resistencia muscular. Físicamente este dispositivo es una interfaz fabricada en plástico con la palma y el brazo del usuario y posee 2 tipos de actuadores rotatorios suaves colocados entre ambos lados. La mayor ventaja del dispositivo es la mínima sensación de restricción cuando el dispositivo no está funcionando (Sasaki *et al.*, 2004). En el mismo año, los dispositivos que combinan la realidad virtual y la rehabilitación tuvieron mayor impulso, tal es el caso de un exoesqueleto de 7 GdL mediante el cual el usuario humano puede interactuar con un ambiente virtual; la articulación del hombro es de tipo esférico y genera aducción-abducción, elevación del hombro y giro en la parte superior del brazo; el codo maneja flexo-extensión y giro del antebrazo. La muñeca posee flexo-extensión y abducción-aducción. La estructura pesa en total 2.3 kg (Chou *et al.*, 2004). *Sarcos Master* es un exoesqueleto de 7 GdL, de poco peso, minimiza la inercia debido a la gravedad y el efecto *Coriolis* de tal forma que los movimientos del brazo del usuario no son afectados.

Para el 2005, las perturbaciones de torque pueden ser aplicadas individualmente a cualquiera o a todos los GdL, derivando en un ambiente dinámico nuevo, para que los sujetos se puedan adaptar al sistema (Mistry *et al.*, 2005). Asimismo en el 2005, se presenta un exoesqueleto en Latinoamérica, específicamente realizado en Colombia. Dicho dispositivo cuenta con 3 GdL. Con rotación interna-externa del húmero, flexión-extensión del codo y pronación-supinación de la muñeca. Para éste prototipo se realizó un análisis biomecánico donde se identificaron 5 GdL del miembro superior (Gutiérrez *et al.*, 2005). En el 2006 el dispositivo diseñado por la *Universidad RICE* es enfocado a la rehabilitación en ambientes virtuales en modo activo y pasivo. Utiliza manipuladores robóticos para generar el movimiento de flexo-extensión en el codo, prono-supinación del antebrazo, flexo-extensión de la muñeca y desviación

radio-ulnar. Está formado por una articulación de revolución en el codo, una articulación de revolución para la rotación del antebrazo y 3 articulaciones esférica-prismática-revolución en serie-paralelo para la muñeca (Sledd y O'Malley, 2006; Gupta y O'Malley, 2006). Mientras que en el 2007, la *Universidad de Saga* desarrolló un exoesqueleto de 4GdL con centro móvil de rotación de la articulación del hombro que ayuda en la rehabilitación de la flexo-extensión vertical y la flexo-extensión horizontal del hombro. En la flexo-extensión del codo y en los movimientos de propinación-supinación del antebrazo. Se encuentra instalado en una silla de ruedas donde personas con debilidades físicas lo pueden utilizar, además de que el usuario no carga el peso del exoesqueleto (Kiguchi, 2007). Asimismo, en el mismo año el dispositivo se realizó *CADEN-7*, que utiliza una abertura de fijación hombre-robot para segmentos superior e inferior del brazo, genera movimientos de flexo-extensión, abducción-aducción y rotación interna-externa del hombro, flexo-extensión del codo, pronosupinación del antebrazo, flexo-extensión y desviación radio-ulnar del antebrazo. La seguridad es implementada en 3 niveles; diseño mecánico, eléctrico y del programa de control (Perry et al., 2007).

Otro dispositivo en el cual sus investigadores han trabajado durante bastante tiempo es *RUPERT* y se han desarrollado 4 versiones. La 1<sup>ra</sup> versión incluía 4 músculos neumáticos, elevación del hombro, extensión y supinación del codo y extensión de la muñeca. Después de considerar las condiciones funcionales de los pacientes, la estructura estaba restringida en la abducción del hombro a un solo plano (15° de forma lateral). La máxima elevación estaba limitada a 45°. Además posee una plataforma que estabiliza la escápula. En la 2<sup>da</sup> versión, se modificó el centro de rotación y la longitud de cada segmento. Sin embargo, esta característica generó el inconveniente de incrementar el peso total y el aumento de la demanda de energía en la articulación del hombro y del codo. La 3<sup>era</sup> versión fue una estructura hecha de fibra de carbono, se desarrolló para disminuir el peso de la versión anterior pero conservando su rigidez, el mecanismo permitió la flexión en el hombro, la flexión del codo, la supinación y propinación. Así como, la flexo-extensión en la muñeca. La 4<sup>ta</sup> versión fue de 5 GdL, aumentando la rotación humeral a los GdL anteriores. Además de poseer un sistema de control adaptativo en lazo cerrado, que permite ayudar a los usuarios a realizar sus tareas tranquilamente, en un ambiente 3D (Chen y Liao, 2006; Sugar et al., 2007; Wei et al., 2008 y Balasubramanian et al., 2008).

*ARMin* fue un proyecto para en cual su desarrollo fue un proceso largo de investigación. La 1<sup>ra</sup> versión fue de 6 GdL, 4 activos y 2 pasivos, a fin de permitir la flexo-extensión del codo y los movimientos espaciales del hombro. Se ocupó en terapias de rehabilitación con la finalidad de recuperar la capacidad de realizar las actividades de la vida diaria. Es ajustable en 5 paráme-

tros. La 2<sup>da</sup> versión fue de 7 GdL siendo dos de ellos acoplados. Contiene sensores que permiten medir las fuerzas de interacción entre el brazo del paciente y el exoesqueleto. Adicionalmente, un sensor de fuerza/torque se colocó en la sección que soporta el antebrazo. Además, para complementar las mediciones, la palanca de la mano fue instrumentada con indicadores de esfuerzo. Así como, con una pantalla donde el terapeuta indica la rutina a seguir. La 3<sup>ra</sup> versión cuenta con 6 GdL activos, siendo 3 para el hombro. Otro para la flexo-extensión del codo, uno más para la pronosupinación del antebrazo y el último corresponde a la flexo-extensión de la muñeca (Nef et al., 2006, Mihelj et al., 2007 y Brokaw et al., 2011).

Recientemente, la empresa *Hocoma* maneja un proyecto denominado *Armeo*<sup>®</sup> que comprende 3 dispositivos para rehabilitación del miembro superior. El proyecto está dirigido a pacientes con lesiones cerebrales y desórdenes neurológicos y se destina a realizar rehabilitación progresiva. Destaca *Power*<sup>®</sup> que fue un desarrollo en conjunto entre el Hospital *ETH Zürich* y la *Universidad Hospital Balgrist*. El cual permite una temprana rehabilitación de las habilidades motrices. Además provee un soporte inteligente del miembro superior en un espacio largo 3D. Los otros dispositivos son denominados *Spring*<sup>®</sup> y *Boom*<sup>®</sup> (Catálogo Hocoma, 2012).

En este trabajo se presenta el desarrollo del diseño de la estructura mecánica de un dispositivo de rehabilitación tipo exoesqueleto que se ajuste a las dimensiones longitudinales de las extremidades superiores y está dirigido para pacientes de la población mexicana. Este nuevo dispositivo es capaz de reproducir los movimientos activos-pasivos realizados por el fisioterapeuta durante las terapias de rehabilitación física por medio de cuatro grados de libertad (tres en el hombro y uno en el codo). El equipo de rehabilitación fue diseñado aplicando la metodología *Blitz QFD*. El método *Blitz QFD* es una herramienta práctica y sintetizada que no requiere de programas de cómputo sofisticadas, ni herramientas específicas (como la casa de la calidad) para ofrecer resultados favorables. Tiene la finalidad de obtener las características adecuadas de rehabilitación del paciente y consta de 7 breves pasos para su operación del paciente; especificaciones deseadas, clasificación de especificaciones, estructurar las necesidades, analizar la estructura de las necesidades, dar prioridad a las necesidades, desplegar las necesidades en orden de importancia, analizar sólo las necesidades prioritarias a detalle (González-Bosch y Tamayo-Enríquez, 2002). También se presentan los análisis numéricos desarrollados en un programa computacional con algoritmo que aplica el Método de Elemento Finito (MEF) para validar la suficiencia estructural del nuevo dispositivo. El nuevo dispositivo es capaz de generar rutinas de movimiento de rehabilitación activa, pasiva y combinada. Además, de que se puede personalizar las longitudes segmentales y individualizar las rutinas

de acuerdo a las deficiencias del paciente mexicano. Asimismo, se puede monitorear la rutina y optimizar de acuerdo a los avances que presenta el individuo.

## Materiales y métodos

El desarrollo del nuevo dispositivo de rehabilitación fue dividido en 2 etapas. La primera se enfoca a la implementación del *Blitz QFD* para el desarrollo de diseño mecánico conceptual. Mientras la segunda etapa exhibe el análisis cuasi-estático, mediante la aplicación del MEF sobre la estructura del dispositivo.

### Diseño conceptual (método *Blitz QFD*)

El método *QFD*, es un método de gestión de calidad que se fundamenta en transformar las necesidades del usuario en la calidad del diseño y aportar mayores índices de calidad, con respecto a los elementos específicos del proceso de fabricación. Donde el *QFD*, desde sus inicios como técnica ha implementado metodologías para acortar el período de desarrollo y reducir los esfuerzos de grupo requeridos. Para la propuesta presentada en este trabajo, se establecieron los parámetros de diseño. Los cuales se dividieron en dimensionales y funcionales como se representa en la tabla 1. Los cuales se obtuvieron a partir de las dimensiones antropométricas de la población mexicana (Avila-Chaurand, 2001).

**Tabla 1.** Parámetros de diseño.

| Dimensionales  | Funcionales   |
|--|---|
| Brazo varía entre 29 a 40 cm.                                    | Flexo-extensión del hombro en el plano sagital en torno al eje transversal: 45 a 50° en extensión y 180° flexión. |
| Antebrazo varía entre 21 a 30 cm.                                | Abducción del hombro en el plano frontal: 0 a 180°.   |
| Hombro distancia entre hombros 39 a 55 cm.                       | Flexo-extensión horizontal del hombro en torno al eje vertical: extensión 30 a 40° y flexión 140°.                |
| Altura del asiento a los pies: 34 a 45 cm.                       | Que el dispositivo pueda realizar los 3 movimientos del hombro de manera continua.                                |
| La altura al hombro en posición sentada varía entre 85 a 108 cm. | Flexión del codo 140-145° (160° de forma pasiva).   |
|  | Pronosupinación del miembro superior: supinación 90°, pronación 85°.  |
|  | Dispositivo para persona con peso máximo de 90 kg.  |

Para cumplir con las necesidades planteadas en parámetros de diseño se generaron 1620 posibles concep-

tos. Para reducirlas se aplican cuatro filtros: el primero (factibilidad) reduce a 128 posibilidades. En el segundo filtro (disponibilidad tecnológica) quedan 32 posibles soluciones. En el tercer filtro no se elimina ninguna combinación. En el cuarto filtro (Matriz de decisión) se obtiene el concepto más adecuado.

Al finalizar la implementación del método *Blitz QFD* se obtiene un diseño conceptual, el de este caso particular es:

- Para ajustar la longitud del brazo y antebrazo fueron propuestas barras telescópicas de desplazamiento manual.
- Para ajustar al grosor del miembro superior se utilizaron correas acolchonadas ajustables.
- La modificación de las dimensiones del mecanismo, en relación al ancho del hombro, se estableció mediante una unidad de rodamientos lineales.
- Para la altura una columna telescópica, la limitación a los elementos deslizables se realizó mediante perillas de 2 posiciones.
- El movimiento de rotación fue producido por servomotores.
- Asimismo, el control de posición se determina mediante un encoder.

El prototipo que cumple con las características resultantes descritas se observa en la figura 1; adicionalmente se indican los grados de libertad pasivos y activos que tiene el dispositivo (se etiqueta GA a los GdL activos y GP a los pasivos). GA1 corresponde a la flexo-extensión del antebrazo y GA2 es la flexo-extensión del hombro en el plano sagital. Mientras GA3 corresponde a la abducción del hombro en el plano coronal y GA4 representa flexo-extensión horizontal del hombro en el plano transversal. GP1 indica el ajuste de la estructura de la sección longitud del antebrazo y GP2 cumple la función en la parte del brazo, GP3 se emplea para ubicar longitudinalmente el dispositivo en el plano coronal y GP4 en el transversal. GP5 se aplica para ajustar el respaldo y posición de la silla. Estos últimos 3 GdL se desarrollaron con la finalidad de colocar en una correcta posición espacial al hombro. En la figura 2 se muestra el ensamble general dividiéndolo en empalmes particulares. En la tabla 2 se indican la clave y nombre de los ensamblés.

El dispositivo se dividió en 4 subsistemas para un mejor desarrollo, estos son:

1. Subsistema del antebrazo.- Está integrado por Q, P y N (figura 2). Su finalidad es soportar el antebrazo del paciente, se modifica la longitud mediante el riel con barrenos de la pieza Q, la perilla sirve para fijar y evitar siga desplazándose.

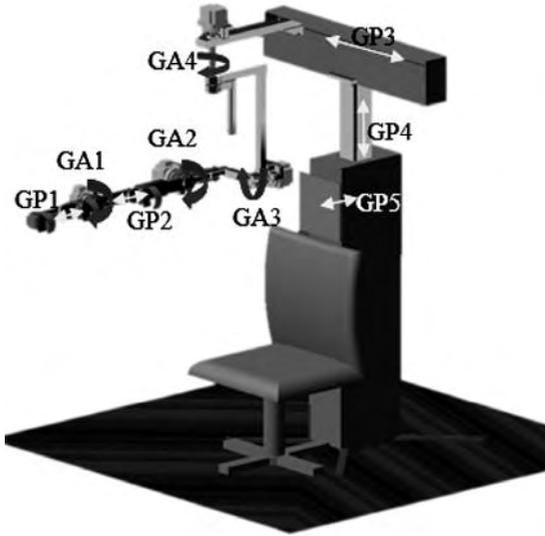


Figura 1. Prototipo (Grados de Libertad).

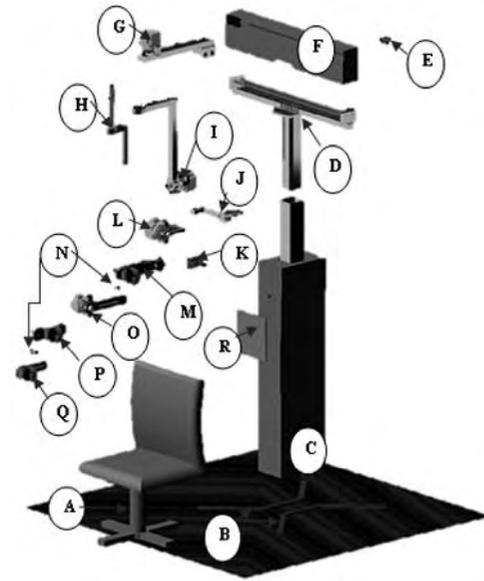


Figura 2. Despiece del diseño.

2. Subsistema del brazo.- La estructura, integrada por O, N y M (figura 2); fue diseñada para permitir el ajuste de la longitud del brazo, el mecanismo es similar al del antebrazo con la diferencia de que es de mayor dimensión. En O se coloca el servomotor que realiza el movimiento GA1.
3. Subsistema del hombro.- Formado por los subsistemas G, H, I, J, K y L (figura 2). Es una estructura que permite realizar los movimientos del hombro en forma independiente e individual. Para esta sección se considerarán las fuerzas externas ya determinadas en las 2 secciones anteriores; el análisis MEF se realizó en 2 partes: En la primera se considera la estructura para generar los movimientos GA2 y GA3. La segunda etapa corresponde a la estructura que realiza el movimiento GA4 y que está integrada por las piezas que unen el exoesqueleto a la base, así como las que transmiten el movimiento desde el servomotor al resto del exoesqueleto y al mismo tiempo soporta toda la estructura;

para poder realizar este movimiento se tiene que desenclavar la estructura del brazo y el antebrazo de la estructura que soporta al servomotor (*Modelo FHA-11C® Marca Harmonic-Drive*) de abducción para así poder desarrollar el giro libremente mencionado, la barra que se usa para la reconfiguración tendrá la capacidad de unirse en la estructura únicamente cuando se utiliza éste movimiento y retirarse cuando no sea así, mediante ajuste por tornillo y tuerca; así como el movimiento de 90° de las 2 piezas que unen la estructura de la abducción frontal.

4. Subsistema base.- Formado por los subsistemas B a F (figura 2). Esta sección se utiliza para modificar el ancho de la espalda o la distancia del hombro, se efectúa a través del desplazamiento del carro móvil (que soporta la estructura que está en contacto con el miembro superior, se elige la unidad

Tabla 2. Claves y nombres de las piezas.

| No. | Pieza            | No. | Pieza          | No. | Pieza           |
|-----|------------------|-----|----------------|-----|-----------------|
| A   | Silla            | G   | Soporte GA4    | M   | Brazo fijo      |
| B   | Apoyo base       | H   | Eje GA4        | N   | Perilla tope    |
| C   | Base fija        | I   | Soporte GA3    | O   | Brazo móvil     |
| D   | Elevador         | J   | Movimiento GA3 | P   | Antebrazo fijo  |
| E   | Perilla respaldo | K   | Unión GA2-GA3  | Q   | Antebrazo móvil |
| F   | Carcasa superior | L   | Soporte GA2    | R   | Respaldo        |

de rodamiento lineal *Modelo LQBR 12-2LS® Marca SKF*) sobre un riel, éste también sirve para iniciar el cambio de la configuración zurda a diestra o viceversa. La posición del paciente es dada mediante el respaldo que está provisto de un soporte para la espalda donde se pueden unir correas que sujeten al paciente, evitando que se pueda llegar a resbalar del asiento o mueva el tronco durante la rehabilitación, ya que éste último punto es algo común en dispositivos de rehabilitación que no sujetan el paciente y pueden ocasionar una lesión a nivel columna vertebral así como disminuir los beneficios del dispositivo al realizar de manera incorrecta la rehabilitación.

### Análisis numérico (MEF)

Se realizó un análisis cuasi-estático de la estructura con la finalidad de obtener los rangos de carga que soporta la estructura por su propio peso y el del paciente. Así como, el torque mínimo necesario para mantener en equilibrio estático el sistema. Las cargas que son aplicadas durante los análisis de elemento finito fueron determinadas mediante un estudio de la extremidad superior (brazo, antebrazo y mano) (figura 3). El análisis es elástico, isotrópico y homogéneo. La discretización fue realizada de manera controlada con elementos en lo general de 10 mm y en las zonas de interés de 1 mm. El elemento que se utilizó fue Kept con 6 grados de libertad. Se realizó convergencia en desplazamiento, rotación, fuerza y momento.



**Figura 3.** Zonas de contacto (sujeción) del exoesqueleto con la extremidad superior.

**Tabla 3.** Materiales utilizados para el análisis (Hibbeler, 2006).

| Material             | Módulo de Young (GPa) | Densidad (kg/m <sup>3</sup> ) | Relación de Poisson | Esfuerzo de Cedencia (MPa) |
|----------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Aluminio 6061        | 69.5                  | 2700                          | 0.33                | 240                        |
| Acero grado A tipo 8 | 200                   | 7850                          | 0.3                 | 600                        |
| Bronce SAE 62        | 103.4                 | 8820                          | 0.34                | 520                        |

Para el caso del análisis numérico utilizando, la estructura mecánica fue desarrollada con diversos materiales y sus características para la evaluación son mostrados en la tabla 3:

- Aluminio 6061.- Se aplicó en la estructura en general.
- Acero grado A tipo 8.- Se empleó para toda la tornillería.
- Bronce SAE 62.- Se utilizó como material de los todos los bujes.

El análisis estructural del mecanismo se divide en 5 casos, ya que el comportamiento de la sección en contacto con la extremidad superior se asemeja a la de una viga en cantiléver (solamente tiene apoyo en un extremo mientras que el otro se encuentra libre). Por lo tanto el extremo libre puede llegar a sufrir desplazamiento generados por las propias características físicas del sistema (peso de los elementos) que afecte el funcionamiento óptimo del sistema. Además de analizar cada una de las secciones del dispositivo, los casos propuestos son los más comunes en el desarrollo de la rehabilitación para pacientes con padecimientos en miembro superior.

### Caso 1. Análisis estructural del antebrazo

Las correas de sujeción soportan el peso del antebrazo y la mano. Por tal motivo, en estas zonas es donde se aplican las cargas a la estructura. La determinación de la magnitud es a partir de considerar una viga con doble apoyo. Siendo el primero el que corresponde a la correa de sujeción del antebrazo (CC) y la segunda, es la correa de sujeción de la muñeca (CM). En la tabla 4 se presentan los datos que fueron tomados como base para determinar las condiciones de frontera de los análisis numéricos. Los datos biomecánicos se basaron en investigaciones de la referencia Lissner y Williams (1991). Asimismo, se indican las fuerzas resultantes, estas son aplicadas tanto a la estructura misma como a las condiciones de frontera para el análisis en el programa MEF (figura 4), el soporte y las restricciones de movimiento fueron colocados alrededor del eje del movimiento GA1.

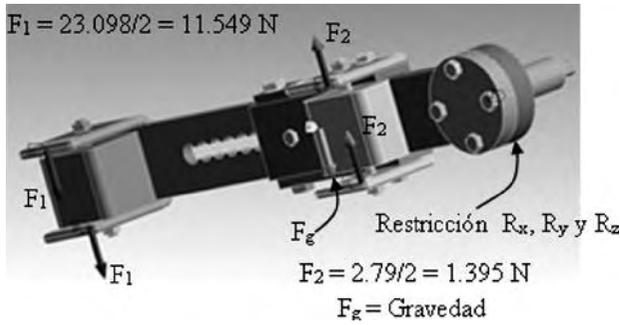


Figura 4. Antebrazo condiciones de carga.

Tabla 4. Parámetros antebrazo y mano.

| Parámetros iniciales   | Parámetros para MEF   |
|--|---|
| Sección antebrazo-mano, Masa de 2.07 kg y Centro de gravedad a 307.52 mm (medido a partir del codo).         | La correa CM soporta 23.098 N.<br><br>La correa CC esta sometida a 2.79 N.          |
| Estructura antebrazo, Masa de 0.844 kg y Centro de gravedad a 131.442 mm (medida a partir del eje del codo). | Se obtiene un torque de 7.33 Nm y una fuerza 28.5863 N en la articulación del codo. |

### Caso 2. Analisis estructural del brazo

En esta sección, la estructura cuenta con una sola correa, con la que se sujeta el brazo del paciente (CB). Adicionalmente se acopló el servomotor (Modelo FHA-14C®) que genera el movimiento GA1. Los datos que se consideraron para este caso se determinaron a partir del peso total de la extremidad superior de forma análoga al caso anterior. Estos datos se muestran en la tabla 5 y son aplicados sobre la estructura para generar las condiciones de frontera en el análisis mediante el programa MEF (figura 5). El soporte y restricción de movimiento se colocaron alrededor del eje del movimiento GA2.

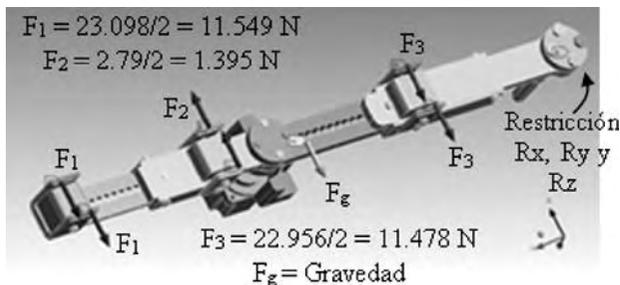


Figura 5. Brazo y antebrazo condición de carga y consideración para la unión.

Tabla 5. Parámetros análisis MEF del brazo.

| Parámetros de entrada   | Parámetros para los análisis MEF   |
|---|--|
| Extremidad superior completa, Masa: 4.41 kg y Centro de gravedad a 368.09 mm (medido desde el hombro).      | La correa CB está sometida a 22.956 N.<br><br>Se obtiene un torque de 26.07 Nm y una fuerza de 71.9364 N en la articulación del hombro (figura 5). |
| Estructura brazo y antebrazo, Masa 2.923 kg y Centro de gravedad a 353.985 mm (medido a partir del hombro). |  |

### Caso 3. Analisis estructural del hombro

El análisis de la sección de la estructura enfocada en la articulación del hombro fue dividido en 2 etapas:

- Primera etapa.- Se analiza la estructura desde la sección del antebrazo hasta el eje del movimiento GA3. Las fuerzas que se aplican como condiciones de frontera son las obtenidas en los casos 1 y 2. El soporte y restricción se coloca en el eje del movimiento GA3 (figura 6).
- Segunda etapa.- Comprende hasta el eje del movimiento GA4. Las condiciones de fronteras son similares a la etapa anterior. Se restringe el movimiento en el eje GA4 (figura 7).

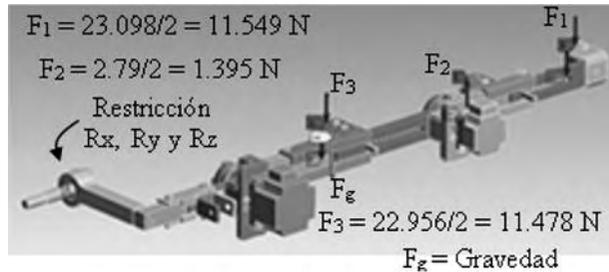


Figura 6. Hombro primera condición de carga.

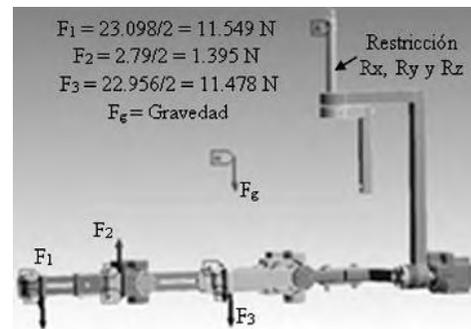


Figura 7. Hombro segunda condición de carga.

#### Caso 4.- Análisis sección superior

Se realizó un análisis de la sección superior completa. Que contempla desde la sección del antebrazo, hasta el soporte superior de la columna de elevación telescópica. Para el análisis fueron propuestas las restricciones de movimiento en dicha pieza y se utilizaron las mismas cargas inducidas por el peso de la extremidad superior (figura 8).

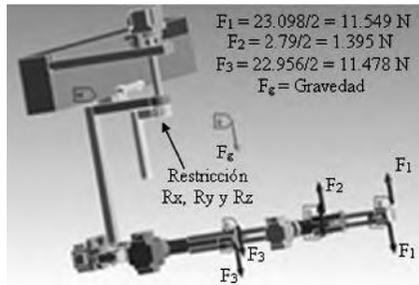


Figura 8. Sección superior condición de carga.

#### Caso 5. Análisis de ejes de transmisión

Para éste caso se analiza el eje del movimiento GA1, donde se utilizó Aluminio 6061. El motor seleccionado fue un *Harmonic Drive Modelo FHA-11C*® que genera un torque de 11 Nm a la estructura. Donde únicamente se analizó el caso en que se encuentra sometido a torsión el eje y no se consideró el efecto cortante, ya que el esfuerzo se aplica directamente a los bujes. Bajos estas consideraciones, se determinaron y aplicaron las condiciones de frontera para el análisis numérico. Las restricciones en movimiento y rotación se colocaron en los barrenos donde se ubican los tornillos de fijación (figura 9). Para el segundo eje, se analizó los movimientos GA2 y GA3. Donde las condiciones de frontera se obtienen de manera similar que al eje anterior. Sin embargo, para el segundo eje existe la variación de que el motor utilizado es *Harmonic Drive FHA-14C*® que genera un torque de 28 Nm (figura 10).

El eje GA4 es importante, porque transmite torque y une a la estructura móvil con la base. El servomotor elegido para este movimiento es *Harmonic Drive FHA-14C*®, que genera 28 Nm de torque. Por lo tanto, en

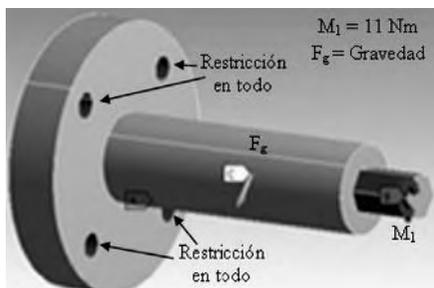


Figura 9. Condición de carga y restricción de movimiento para Eje GA1.

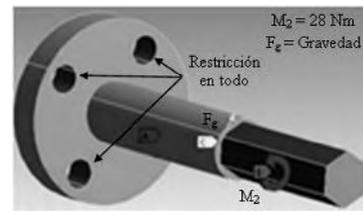


Figura 10. Condición de carga y restricción de movimiento para Eje GA2.

este análisis se aplica el torque antes mencionado y una fuerza de 147.15 N (la que somete a esfuerzo de tensión al eje y es originada por el peso de la estructura (figura 11)).

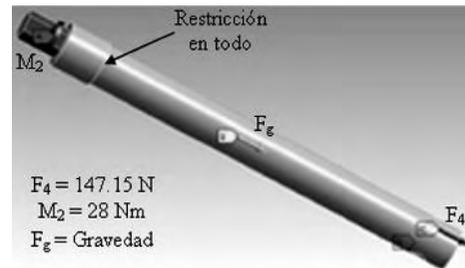


Figura 11. Condición de carga y restricción de movimiento para Eje GA4.

#### Resultados

Los resultados por la simulación numérica (MEF) se muestran a continuación. Es importante mencionar que se utilizó la teoría de falla para materiales dúctiles de von Mises. En las figuras 12 y 13 se presentan los resultados obtenidos para esfuerzo de von Mises y desplazamiento para la sección del antebrazo.

Mientras en las figuras 14 y 15 se presentan los resultados numéricos obtenidos para esfuerzo de von Mises y desplazamiento para la sección del brazo.

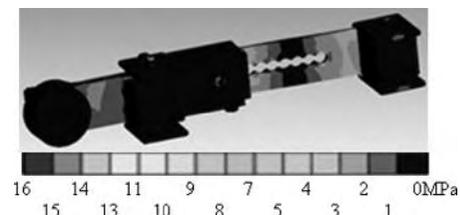


Figura 12. Antebrazo (esfuerzo de von Mises)

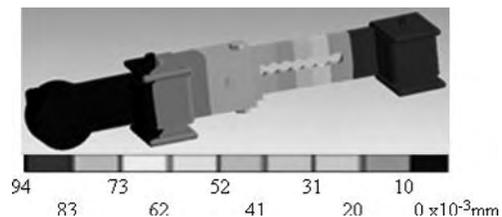


Figura 13. Antebrazo desplazamiento en z

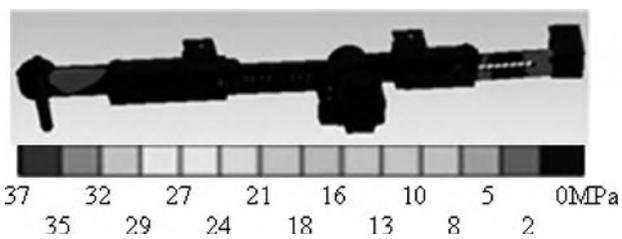


Figura 14. Brazo-antebrazo (esfuerzo de von Mises)

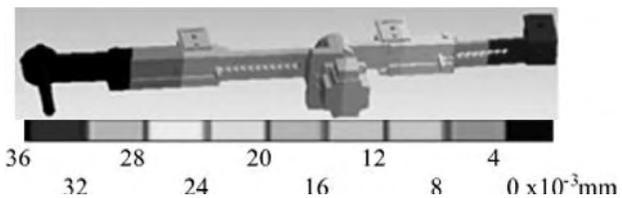


Figura 15. Brazo-antebrazo desplazamiento en z

En las figuras 16 y 17 se presentan los resultados obtenidos para esfuerzo de von Mises y desplazamiento para la primera etapa de carga sobre el hombro.

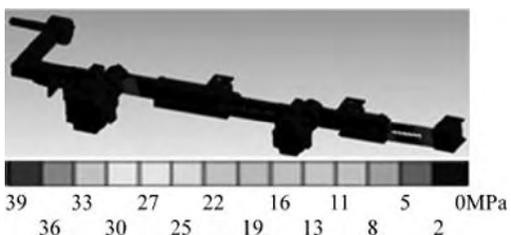


Figura 16. Primera etapa de carga hombro (esfuerzo de von Mises)

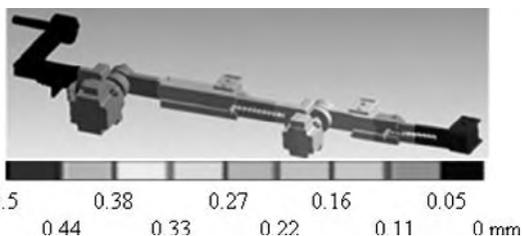


Figura 17. Primera etapa de carga hombro (desplazamientos en z)

En las figuras 18 y 19 se presentan los esfuerzos de von Mises y desplazamiento para la segunda etapa de carga en hombro.

Por último en las figuras 20 a 25 se presentan los resultados numéricos obtenidos para esfuerzo de von Mises y desplazamiento en los ejes GA1, GA2 y GA4, respectivamente.

### Discusión

Las deformaciones mostradas en algunos de los casos (ambas etapas del hombro y ejes GA2 y GA4) son considerables con respecto a los otros casos. Sin em-

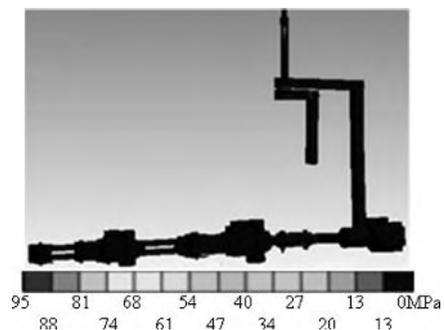


Figura 18. Segunda etapa de carga hombro (esfuerzo de von Mises)

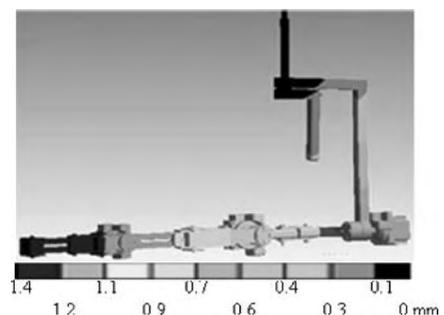


Figura 19. Segunda etapa de carga hombro (desplazamientos en z)

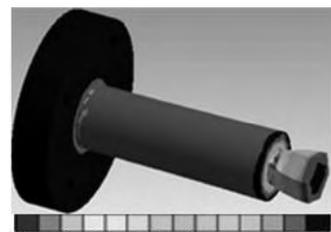


Figura 20. Eje GA1 (esfuerzo de von Mises)

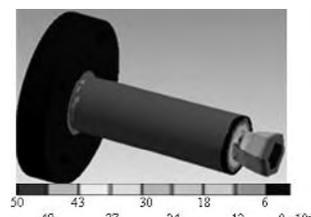


Figura 21. Eje GA1 (desplazamiento en x)

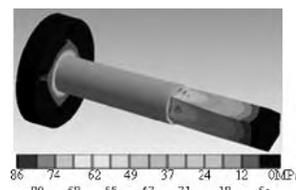


Figura 22. Eje GA2 (esfuerzo de von Mises)

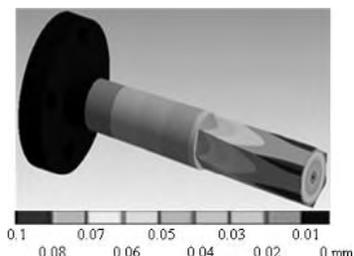


Figura 23. Eje GA2 (desplazamiento en x)

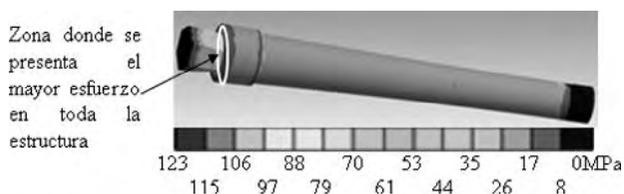


Figura 24. Eje GA4 (esfuerzo de von Mises)

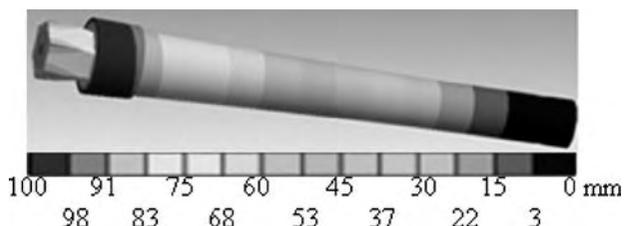


Figura 25. Eje GA4 (desplazamiento en x)

bargo, los resultados encontrados en magnitud no son significativos para causar daño en la estructura. Lo anterior se debe a que son desplazamientos acumulados de las secciones anteriores.

Para el caso 1 de antebrazo, donde la deformación resultante máxima fue de  $94 \times 10^{-3}$  mm, es el único donde no se va a poder realizar esta corrección de posición. Se considera desde el punto de vista mecánico que no son preocupantes las deformaciones resultantes obtenidas en el análisis para desarrollar una falla de operación.

La complejidad en la geometría e interfaces de unión del exoesqueleto dificultan el desarrollo del análisis numérico. Lo anterior se debe a la interacción de todas las piezas, lo cual produce que sea necesaria la aplicación de una gran cantidad de nodos y elementos. Asimismo, por la magnitud de las cargas aplicadas solo fue necesario aplicar los conceptos de elasticidad del material y teoría de falla (von Mises). Con los que es posible determinar el valor de los esfuerzos (materiales dúctiles) y las zonas críticas. Por medio de las figuras anteriores, es posible visualizar los puntos de probable falla, que se encuentra en concentradores de esfuer-

zos (como era de esperarse). Sin embargo, los valores de los esfuerzos no están cercanos al valor del esfuerzo de cedencia, por lo que no son relevantes.

Los esfuerzos de mayor valor presentados en los casos 1 y 2 se ubican en la perilla (pieza N de la figura 2). Esto se debe a su función de limitación del movimiento ya que por ello sufren aplastamiento. El prototipo obtenido por la aplicación del *Blitz QFD* soporta adecuadamente las condiciones carga que se estimaron.

### Movimientos de rehabilitación

Los movimientos de rehabilitación (activa y pasiva) para la flexo-extensión del codo se realizan cuando existe una flexión del hombro en el plano sagital a  $90^\circ$  (figura 26a), con esta configuración es posible realizar el movimiento de flexión máxima que varía entre  $140^\circ$ - $145^\circ$  (según las características del paciente (figura 26b)). Donde para el codo el movimiento de extensión es nulo. Para la flexo-extensión del hombro en el plano sagital, se inicia desde la posición neutra. Es decir,  $0^\circ$  (figura 26c). La extensión se realiza con una amplitud de  $45^\circ$ - $50^\circ$  (figura 26d). Mientras que la flexión se realiza a valores de  $180^\circ$  (figura 26e). En la figura 26f, se observa la implementación del dispositivo en un usuario realizando la flexión del codo. Finalmente en la figura 26g el paciente realiza la flexión del hombro en el plano sagital.

### Trabajos futuros

Se resalta que en éste trabajo solo se reporta la parte correspondiente al análisis de la estructura (mecánica). Es importante mencionar que faltaría considerar las etapas del diseño de control, en las cuales se incluyen rutinas para corrección de posición mediante los sensores y motores que se utilizan. Asimismo, la etapa de control eléctrico-electrónico y la de interfaz a un ambiente 3D que genere una mayor motivación en el usuario a realizar terapias de rehabilitación con éste dispositivo, se realizará como la siguiente etapa de desarrollo del proyecto general. Estas actividades se realizan con base en las señales electromiográficas obtenidas por electrodos que se colocan en la extremidad superior del paciente (Torres-San Miguel *et al.*, 2011).

### Conclusiones

Se realizó el diseño mecánico de un exoesqueleto para rehabilitación de miembro superior utilizando la metodología denominada *Blitz QFD*. El nuevo dispositivo se realizó de acuerdo a las especificaciones de pacientes con una antropometría mexicana. La configuración que este equipo exhibe son 4 GdL activos, que son los mínimos que se necesitan para desarrollar patrones de rehabilitación en el paciente con deficiencias en miembro superior. Por otro lado, fueron necesarios 4 GdL pasivos para ajustar longitudinalmente los segmentos

de la estructura del dispositivo. Es importante resaltar, que el sistema de riel barrenado es el más apropiado para el fenotipo mexicano, que se emplea para realizar el ajuste longitudinal y es capaz de lograr un acople entre la estructura con el antebrazo y brazo del individuo. Es importante mencionar, que los dispositivos mencionados en la introducción de este trabajo, no se diseñaron para población mexicana (en lo que se refiere a longitudes segmentales), lo que genera desajustes considerables entre los centros de rotación de las articulaciones humana y mecánica. Que si bien, no genera un daño en terapias activas, si lo hace en las terapias pasivas.

Dentro de los análisis por medio del MEF, se pudo comprobar que el sistema estructural del nuevo sistema de rehabilitación se encuentra dentro de los rangos de soportar las cargas de servicio. Sin embargo, el resultado donde el valor máximo de esfuerzo es de 123 MPa (figura 24), solamente afecta a una pieza. Por lo que el resto de la estructura soporta menos esfuerzos y se considera que el diseño es aceptable. En el caso de los desplazamientos que se presentan en la estructura en los casos 3 (primera etapa) y 4, son considerables. No obstante, se hace hincapié en que el problema se corrige durante la etapa de posicionamiento y control, aunado a que la estructura de las secciones del antebrazo presenta un desplazamiento del rango de centésimas de milímetro. No se ha considerado ninguna técnica de optimización geométrica, ya que los resultados son aceptables y las dimensiones están realizadas para poder brindarle soporte y comodidad al usuario.

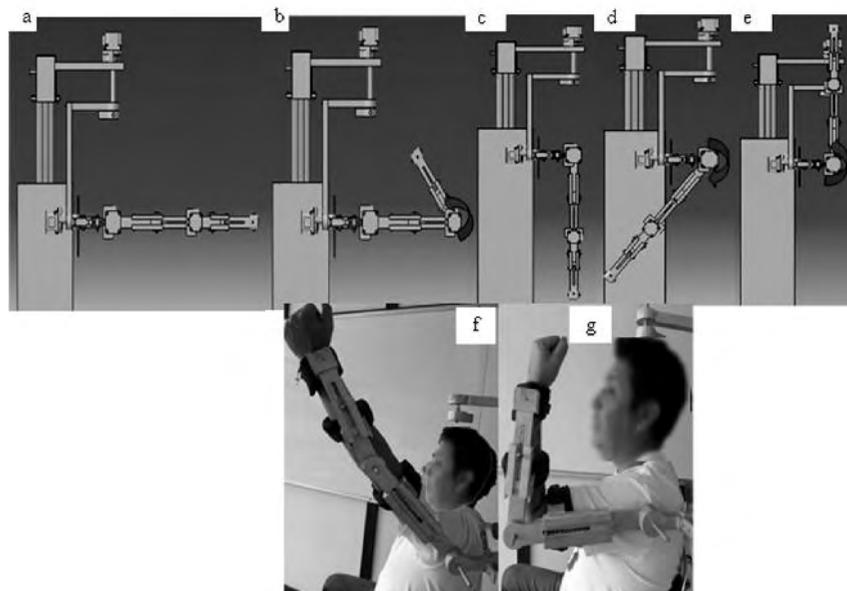
El equipo de rehabilitación aquí presentado, fue diseñado con el propósito de ayudar en la rehabilitación física mediante la generación de rutinas variables de movimiento continuo. Donde este equipo es capaz de auxiliar en los movimientos de flexo extensión del hombro en el plano sagital, en el plano horizontal y la abducción en el plano coronal. Además del movimiento de flexo-extensión del codo. Con los anteriores movimientos éste dispositivo es capaz de proporcionar un sin número de rutinas para el paciente. Así como, por medio de sensores de posición angular, recolectar los datos para retroalimentar al usuario de los avances o retrocesos que se van presentando. Adicionalmente, este equipo se podrá utilizar desde la etapa temprana de la lesión (donde se requiere recuperar movilidad y fuerza) hasta las etapas donde se desea recuperar la fineza de los movimientos. Esto se logra a través de la combinación de movimientos activos-pasivos. Que lo anterior es una gran ventajas en comparación con otros dispositivos, que sólo actúan en la etapa de ajuste fino (como es el caso del dispositivo *Armeo Spring*<sup>®</sup>).

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo proporcionado para la realización de esta investigación.

### Referencias bibliográficas

Avila-Chaurand, R, Prado-León, L. R. y González-Muñoz, E. L. (2001). Dimensiones Antropométricas, Población Latinoamericana. México: Ed. Universidad de Guadalajara, 111-123.



**Figura 26.** Movimientos de rehabilitación. a) Flexión codo a 0°. b) Flexión máxima del codo. c) Flexión del hombro en el plano sagital a 0°. d) Extensión máxima del hombro. e) Flexión máxima del hombro. f) Paciente realizando flexión del codo. g) Paciente realizando flexión del hombro.

- Balasubramanian, S., Wei, R. y He, J. (2008). RUPERT Closed Loop Control Design, 30th Annual International IEEE EMBS Conference, 3467-3470.
- Brokaw, E. B., Nichols, D., Holley, R. J., Murray, T. M., Nef, T., y Lum, P. S. (2011). Time independent functional task training: a case study on the effect of inter-joint coordination driven haptic guidance in stroke therapy, 2011 IEEE International Conference on Rehabilitation Robotics, 1-6.
- Catálogo Hocoma. (2012). Armeo® Therapy Concept, Catálogo de productos, 1-2.
- Cabrero-Rayo, A., Martínez-Olazo, O., Laguna-Hernández, G., Juárez-Ocaña, R., Rosas-Barrientos, V., Loria-Castellanos, J., Medellín-García, R., Cerón-Juárez, R., Sánchez-Mata, F., Álvarez-Torrecilla, L. y Rumbo-Nava, U. (2008). Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Medicina Interna de México*. 24 (2), 98-103.
- Chen, J. y Liao W. (2006). A leg exoskeleton utilizing a magnetorheological actuator, IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics, 824-829.
- Chou, W., Wang, T. y Xiao, J. (2004). Haptic interaction with virtual environment using an arm type exoskeleton device, 2004 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 1992-1997.
- González-Bosch, V. y Tamayo-Enríquez, F. (2002). Blitz QFD, Asociación latinoamericana de QFD, 1-3.
- Gupta, A. y O'Malley, M. K. (2006). Design of a haptic arm exoskeleton for training and rehabilitation, IEEE/ASME Transactions on Mechatronics. 11 (3), 280-289.
- Gutiérrez, R., Vanegas, F., Avilés, O. y Niño, P. (2005). Prototipo Exoesqueletico para Rehabilitación de Miembro Superior, CE-NIDET, 2-6.
- Hogan, N., Krebs, H.I., Charnnarong, J., Srikrishna, P., Sharon, A. (1992). MIT - MANUS: A Workstation for Manual Therapy and Training I, IEEE International Workshop on Robot and Human Communication, 161-165.
- Hibbler, R. C. (2006). *Mecánica de Materiales*. México: Prentice Hall, 877-879.
- Kiguchi, K. (2007). Active exoskeletons for upper-limb motion assist. *International Journal Humanoid Robotics*, 4 (3), 607-624.
- Lissner, H. R. y Williams, M. (1991). *Biomecánica del Movimiento Humano*. Trillas, pp. 227-239.
- Mihelj, M., Nef, T. y Riener, R. (2007). ARMin II-7 DoF rehabilitation robot: mechanics and kinematics. 2007 IEEE International Conference on Robotics and Automation. 4120-4125.
- Mistry M., Mohajerian P. y Schaal, S. (2005). Arm movement experiments with joint space force fields using an exoskeleton robot. 9th International Conference on Rehabilitation Robotics, 408-413.
- Nef, T., Mihelj, M., Colombo, G., y Riener R. (2006). ARMin-Robot for rehabilitation of the upper extremities. 2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 3152-3157.
- Perry J. C., Rosen, J. y Burns, S. (2007). Upper limb powered exoskeleton design. IEEE/ASME Transactions on Mechatronics. 12 (4), 408-417.
- Pons, J. L. (2008). *Wearable Robots: Biomechatronic Exoskeleton*. John Wiley & Sons Ltd. pp. 1-15.
- Rodríguez-Prunotto, L., Cano-de la Cuerda, R., Cuesta-Gómez, A., Alguacil-Diego, I. M. y Molina-Rueda, F. (2014). Terapia robótica para la rehabilitación del miembro superior en patología neurológica. *Rehabilitación Elsevier*, Article in Press, 1-25.
- Sabater, J. M., Azorín, J. M., Pérez, C., García, N., y Menchón, M. (2007). Ayuda robótica para la rehabilitación de miembros superiores. 2do Congreso Internacional sobre Domótica, Robótica y Telesistencia para Todos, DRT4all 2007. 19-28.
- Sasaki, D., Noritsugu, T., y Takaiwa, M. (2004). Development of active support splint driven by pneumatic soft actuator (ASSIST). IEEE International Conference on Robotics and Automation. 520-525.
- Secretaría de Salud Federal de México. (2009). Guía de referencia rápida. Rehabilitación de adultos con enfermedad vascular cerebral. Guía de práctica clínica. Catálogo Maestro: DIF-331-09, 2-4.
- Secretaría de Salud Federal de México. (2009). Rehabilitación de adultos con enfermedad vascular cerebral. Evidencias y recomendaciones. Guía de práctica clínica. Catálogo Maestro: DIF-331-09, 18-20.
- Sledd, A. y O'Malley, M. K. (2006). Performance enhancement of a haptic arm exoskeleton. 14th Symposium on Haptic Interfaces for Virtual Environment and Teleoperator Systems. 375- 381.
- Sugar, T. G., He, J., Koeneman, E. J., Koeneman, J. B., Herman, R., Huang, H., Schultz, R. S., Herring, D. E., Wanberg, J., Balasubramanian, S., Swenson, P. y Ward, J. A. (2007). Design and Control of RUPERT: A Device for Robotic Upper Extremity Repetitive Therapy. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 15 (3), 336-346.
- Tsagarakis N. G. y Caldwell D. G. (2003). Development and control of a 'soft-actuated' exoskeleton for use in physiotherapy and training. *Autonomous Robots*, 15 (1), 21-33.
- Torres-San-Miguel, C. R., Velázquez-Sánchez, A. T., Lugo-González, E., & Tapia-Herrera, R. (2011). Diseño personalizado de una interfaz mioeléctrica para una prótesis de miembro superior. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 70-83.
- Wei, R., Balasubramanian, S., Xu, L. y He, J. (2008). Adaptive Iterative Learning Control Design for RUPERT IV. *2nd Biennial IEEE/RAS-EMBS International Conference on Biomedical Robotics and Biomechatronics*, 647-652.

# Efecto antibacteriano *in vitro* de exudados foliares de tabaco contra dos bacterias fitopatógenas

## *In vitro* antibacterial effect of tobacco leaf exudates against two bacterial plant pathogens

Yanelis Capdesuñer Ruiz\*, Maribel Rivas Paneca\*, Erinelvis Rodríguez Hernández\*\*, Madelín Gallo Rodríguez\*\*, Janet Quiñones Galvez\*, Ermis Yanes Paz\*, Martha Hernández de la Torre\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50707

### Resumen

Los productos naturales son una alternativa para el control de microorganismos que ocasionan enfermedades en los cultivos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes solventes para la obtención de extractos crudos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco, y el efecto *in vitro* de estos extractos contra dos bacterias fitopatógenas: *Xanthomonas campestris* (Xc) y *Pectobacterium carotovorum* (Pc). Se evaluaron solventes con polaridades entre 3.1 y 6.2 (diclorometano, n-butanol, acetato de etilo, metanol y etanol 90 %). El etanol 90 % se seleccionó como mejor solvente y como sustituto del diclorometano por su mayor rendimiento. Los extractos etanólicos crudos se obtuvieron a partir de exudados foliares de diez líneas de tabaco seleccionadas. La diversidad de la composición química de los extractos etanólicos se reveló por cromatografía en capa delgada. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar con discos de papel de filtro y la medición del diámetro del halo de inhibición. Se observó inhibición para todos los extractos contra Xc destacándose los correspondientes a las líneas Nic 1061 "TI 1738" y Nic 1016 "Incekara" hasta 5 µg de extracto crudo /disco, con un mayor rendimiento para la línea Nic 1061. El extracto de la línea Nic 1015 fue el único con actividad contra Pc hasta 5 µg de extracto crudo seco por disco. Estos resultados sugieren un uso potencial de los extractos crudos de las líneas Nic 1061 y Nic 1015 "TI 1341" como un agente efectivo para la protección de cultivos contra estas bacterias.

**Palabras clave:** fitopatógenos, *Nicotiana tabacum*, protección de cultivos, solventes, superficie foliar.

### Abstract

Natural products are an alternative to control microorganisms that cause diseases in crops. This work aimed to evaluate different solvents for obtaining crude extracts from tobacco leaf exudates and to determine *in vitro* effect of these extracts against two phytopathogenic bacteria: *Xanthomonas campestris* (Xc) and *Pectobacterium carotovorum* (Pc). Crude extracts from ten tobacco lines using solvents with polarities between 3.1 and 6.2 (dichloromethane, n-butanol, ethyl acetate, methanol and ethanol 90%) were obtained. Ethanol 90% was selected as the best solvent for obtaining extracts from tobacco leaf exudates and as a substitute of dichloromethane due to the best yield. The chemical composition diversity of the ethanolic extracts was revealed by thin-layer chromatography. The antibacterial activity was evaluated by agar disk diffusion method recording the inhibition zones. Growth inhibition was observed for all extracts against Xc, and the better activity corresponded to the lines Nic 1061 "TI 1738" and Nic 1016 "Incekara" until a minimal amount of 5 µg/ disc, with higher yield in case of the line Nic1061. Only the extract of the line Nic 1015 was able to inhibit the growth of Pc until a minimal inhibitory concentration of 5 µg/disc. These results suggest a potential use of crude extracts from lines Nic 1061 and Nic 1015 "TI 1341" as an effective agent for the crop protection against Xc and Pc respectively.

**Key words:** phytopathogens, *Nicotiana tabacum*, crop protection, solvents, leaf surface.

**Recibido:** noviembre 18 de 2014

**Aprobado:** abril 24 de 2015

\* MSc Yanelis Capdesuñer Ruiz, MSc Maribel Rivas Paneca, MSc Janet Quiñones Gálvez, MSc Ermis Yanes Paz, Dra Martha Hernández de la Torre, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½. Ciego de Ávila, CP69450, Cuba, Email: ycapdesuner@bioplantass.cu, yaneliscr@gmail.com.

\*\* MSc Erinelvis Rodríguez Hernández, MSc Madelín Gallo Rodríguez. UCTB Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán. Sancti Spiritus. Cuba.

## Introducción

Las plantas son fuente de alimentación para el reino animal y son afectadas por plagas y enfermedades que causan severas pérdidas anuales. El control de estas se basa, generalmente, en la utilización de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido problemas de desequilibrio ambiental, de salud humana y el surgimiento de plagas y enfermedades más agresivas y resistentes. Existe referencia de una alta incidencia de enfermedades y diversos cuadros clínicos por intoxicación en la población, también se detectan elevados niveles de pesticidas en cosechas y personas (Martínez *et al.*, 2010). El empleo irracional de fungicidas contamina aguas y suelos, ante lo cual las empresas productoras de estos compuestos están actualmente obligadas a sintetizar compuestos inocuos y a la vez efectivos. Este hecho ha creado una discrepancia entre la necesidad de los agricultores de proteger sus cultivos de las enfermedades, y la exigencia cada vez mayor de los mercados por disponer de alimentos más saludables (Lara y Landero, 2012). Como consecuencia, se buscan otras alternativas, entre ellas el uso de derivados botánicos para el control de plagas y enfermedades. Varias especies de plantas son materia prima para producir insecticidas comerciales (Celis *et al.*, 2008) por ello, actualmente se realizan múltiples estudios para aislar e identificar los metabolitos secundarios que presentan actividad defensiva, con la finalidad de extraerlos de las plantas y usarlos en el control de enfermedades (Lara y Landero, 2012).

Las plantas seleccionadas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como plaguicidas naturales, deben ser de fácil cultivo y con metabolitos secundarios con potente actividad, alta estabilidad química y de óptima producción (Cutler *et al.*, 1986). El tabaco es una planta de ciclo corto, considerada modelo de la familia *Solanaceae* y muy conocida por presentar compuestos tóxicos como mecanismos de defensa lo que la hace atractiva para estos fines. La superficie de la hoja de tabaco está cubierta por tricomas, en su mayoría glandulares (Akers *et al.*, 1978, Wagner, 1991) que están involucrados en la secreción de compuestos, principalmente diterpenos y ésteres de azúcares, seguidos de ceras y un menor número de compuestos volátiles y variados (Severson *et al.* 1984, Wagner, 1999; Tissier, 2012). Se cree que al encontrarse un gran número de estos compuestos en la superficie foliar, estén involucrados fundamentalmente en la defensa contra insectos y otros patógenos (Reuveni *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2004; Shepherd *et al.*, 2005; Amme *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2012).

Por otra parte el aislamiento de estos compuestos de la superficie foliar, utilizando cada vez técnicas más eficientes y sencillas, permitirá obtener estos productos con un mayor grado de pureza, con una menor contaminación celular debido a la ventaja que tienen estos metabolitos de producirse en estructuras ex-

ternas de la hoja y su secreción a la superficie de la misma. Varios solventes orgánicos han sido utilizados con estos fines (Bailey *et al.*, 1975; Chang and Grunwald, 1980; Ohnishi *et al.*, 1983; Reuveni *et al.*, 1987; Lin and Wagner, 1994; Eklund *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004) y entre ellos el diclorometano ha sido el más usado (Severson *et al.*, 1984; Wagner *et al.*, 2004). El diclorometano es uno de los solventes más usados para la extracción de una amplia variedad de metabolitos por ser altamente eficiente, debido a su alto poder de disolución, excelente propiedad de reciclado, alta estabilidad y elevada pureza (Rossberg *et al.*, 2006). No obstante, su uso presenta riesgos potenciales para la salud causando vértigo, somnolencia y pérdida del conocimiento por inhalación entre otros. Otros peligros en el uso de diclorometano es su reacción violenta con bases y oxidantes fuertes, originando peligro de incendio y explosión, y la reacción con algunas formas de plástico, caucho y recubrimientos (ILO, 2005). Todo esto ha provocado en los últimos años, una tendencia a evitar su uso y el surgimiento de nuevas regulaciones en muchos países (ILO, 2005; USDHHS, 2000; SCOEL recommendations 2009; Commission Regulation (EU), 2010), lo que nos obliga a buscar alternativas de sustitución, ya que las investigaciones se enfocan en otros usos alternativos del tabaco para la obtención de productos naturales (Wagner *et al.*, 2004).

*Xanthomonas campestris* y *Pectobacterium carotovorum*, esta segunda también conocida como *Erwinia carotovora*, son dos bacterias fitopatógenas del suelo con un amplio rango de hospederos que incluye cultivos de elevada importancia agrícola como: tomate, papa, algodón, zanahoria, cucurbitáceas, cebolla, pimiento entre otras plantas, por lo que estas bacterias pertenecen a la lista de las 10 bacterias patógenas de mayor importancia científica y económica (Mansfield *et al.*, 2012), y hasta el momento no se ha desarrollado una protección totalmente eficaz contra ellas.

Este trabajo tiene como objetivo general obtener extractos crudos a partir de los exudados foliares de diferentes líneas de tabaco para su posterior uso en el control de plagas y enfermedades de cultivos de importancia agrícola. Los objetivos específicos son: determinar el solvente capaz de sustituir el diclorometano en la obtención de extractos crudos de tabaco activos contra bacterias patógenas y determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de estos extractos crudos obtenidos a partir de varias líneas contrastantes de tabaco frente a estas dos bacterias fitopatógenas como primer paso en la selección de líneas de tabaco candidatas para la obtención de productos naturales como control de enfermedades bacterianas.

## Materiales y métodos

**Cepas bacterianas:** Las cepas patogénicas *Xanthomonas campestris*, aislada de tomate y *Pectobacterium*

*carotovorum* aislada de papa, se proporcionaron por el Instituto de Sanidad Vegetal, Habana, Cuba y se preservaron en agar nutritivo que contiene 4 % de glicerol a 4 °C hasta su uso.

**Material Vegetal:** Se sembraron 10 accesiones de tabaco en semillero y bandejas flotantes (Cristanini, 1995) en la Estación de Tabaco de Cabaiguán, Sancti Spiritus, Cuba. Las siguientes líneas se proporcionaron por el Banco de Germoplasma del IPK-Gatersleben, Alemania: Nic 1003 ("TI 66"), Nic 1006 ("TI 193"), Nic 1015("TI 1341"), Nic 1016 ("Incekara"), Nic 1017 ("Red Russian"), Nic 1019 ("TI 998"), Nic 1061 ("TI 1738"), SNN (Samsung). Las líneas BHmN y CE (Corrojo Especial) por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba.

A los 45 días las plantas se individualizaron y trasplantaron a bolsas para un total de 10 plantas por línea. Setenta días después de su trasplante a bolsas, se evaluaron indicadores como número de hojas, altura de la planta y masa fresca foliar. El análisis de los datos se realizó con el utilitario Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (versión 15 para Windows, SPSS Inc.). Se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA de un factor y Tukey) y las diferencias entre las medias se analizaron para  $p \leq 0.05$ .

#### **Experimento 1: Determinación del solvente para la obtención de los extractos crudos de exudados foliares de tabaco.**

Con el objetivo de seleccionar el mejor solvente para obtener los extractos crudos de exudados foliares de tabaco, se evaluaron cinco solventes con polaridades entre 3 and 6: diclorometano (3.1), n-butanol (3.9), acetato de etilo (4.4), metanol (5.1) y etanol 90% (6.2).

Se utilizaron de 5 a 6 hojas más jóvenes de dos plantas de la línea Nic 1061 para cada tratamiento lo que correspondió con una masa fresca de aproximadamente 60 g. Las plantas tenían una altura promedio de 80 cm. Se sumergieron las hojas en 500 mL del solvente, cuatro veces durante siete segundos, se filtraron a través de papel, se concentraron por rotoevaporación hasta un volumen de 50 mL y se guardaron a -20°C hasta su posterior evaluación. Se determinó el rendimiento expresado en mg de masa seca del extracto/g de masa fresca foliar.

Para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de exudados foliares obtenidos a partir de diferentes solventes, se corrieron en cromatofolios de gel de sílice (DC-Tarjetas SI F 20 x 20 cm, Riedel de la Haën). La placa se activó 10 min a 60°C y la aplicación se realizó con 10 gotas por muestras. Se utilizó como sistema eluyente: benceno: acetato de etilo (86:14). Después de la corrida los cromatofolios se secaron 2-3 min a 60°C. El revelado se realizó con

una solución de ácido fosfomolibdico (20 g de ácido fosfomolibdico en 100 mL de etanol absoluto.

#### **Experimento 2: Obtención de extractos crudos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco.**

Se tomaron tres plantas de las 10 líneas sembradas y se evaluó el número de hojas, la altura de las plantas, la masa fresca foliar y la masa seca foliar para determinar la tasa masa seca/masa fresca.

A partir de las hojas de tres plantas la extracción se realizó de la misma manera que en el experimento anterior utilizando como solvente el etanol 90 %. Se determinó la concentración de los extractos expresada en mg de masa seca·mL<sup>-1</sup> de solvente (dato no mostrado), y el rendimiento expresado en mg de extracto seco·g<sup>-1</sup> de masa fresca foliar, así como también se realizó una cromatografía de capa fina como se explica en el experimento anterior.

#### **Experimento 3: Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de tabaco frente a bacterias fitopatógenas.**

El ensayo de actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar usando discos de papel de filtro (Valgas *et al.*, 2007). Las placas se inocularon con cada bacteria (*Xanthomonas campestris* y *Pectobacterium carotovorum*) a DO 625 nm de 0.15 y 0.17 respectivamente. Una alícuota de 100 µL de solución bacteriana se extendió encima del medio Luria Bertani (LB).

Los extractos secos se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 y 25 µg·µL<sup>-1</sup>. Con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos a partir de los de diferentes solventes y los obtenidos a partir de las diferentes líneas utilizando el solvente seleccionado (experimentos 1 y 2) se aplicaron 20 µL de la concentración 25 µg·µL<sup>-1</sup> en discos de papel de filtro estériles de 0,7 cm de diámetro.

Con el objetivo de determinar diferentes concentraciones de los extractos se aplicaron 1, 5, 10, 15 y 20 µL (5, 25, 50, 75 y 100 µg respectivamente) de la concentración 5 µg·µL<sup>-1</sup> y 8, 12, 16 y 20 µL (200, 300, 400 y 500 µg respectivamente) de la concentración 25 µg·µL<sup>-1</sup> en discos de papel de filtro estériles de 0,7 cm de diámetro.

Los discos con los extractos se secaron y colocaron a una distancia entre ellos de 1.5-2,0 cm en las placas, previamente inoculadas con cada bacteria. La solución de kanamicina a 50 µg·µL<sup>-1</sup> (10 µL) se usó como un control positivo en el ensayo *in vitro*, al ser la bacteria susceptible a este antibiótico. Se utilizó el dimetilsulfóxido como control negativo o control de solvente (20 µL) para todos los casos, ya que este fue el solvente utilizado para disolver los extractos secos.

Las placas se incubaron por 24 h a 37°C y se midió el diámetro del halo de inhibición incluyendo el diámetro del disco. Cada tratamiento se hizo por triplicado y el experimento por duplicado.

## Resultados y discusión

A los 70 días después del trasplante a bolsas las líneas con mayor altura y número de hojas fueron Nic 1016, SNN y Nic 1061, (tabla 1). Estos dos indicadores generalmente tienden a estar muy relacionados porque a medida que la planta crece en altura emite un mayor número de hojas durante este crecimiento.

Las plantas con mayor altura se encontraron en las líneas mencionadas pero sin diferencia con la línea CE, cubriendo valores entre 60 y 68 cm aproximadamente, lo que corresponde a una altura pequeña para la edad de las plantas pero normal para condiciones de bolsas en invernadero. Las plantas con altura mediana presentaron valores entre 40 y 55 cm aproximadamente. La línea de menor altura fue la BHmN sin diferencia con la Nic 1015 que mostraron alrededor de 35 cm (tabla 1).

Para el caso del número de hojas se definen tres grupos; un primer grupo comprendido por las líneas Nic 1016, SNN y Nic 1061 con los mayores valores entre 18 y 19 hojas por planta, un segundo grupo en el que se encuentra la línea Nic 1003 con 16 hojas y un tercer grupo representado por el mayor número de líneas con valores de entre 12 y 14 hojas por planta (tabla 1).

La masa fresca total de hojas de tres plantas por línea varió entre 50 g y 450 g aproximadamente lo cual está influenciado por el número de hojas por planta, aunque líneas con menor número de hojas mostraron altos valores de masa fresca ((BHmN, Nic 1019 y CE

(tabla 1). La relación masa seca/masa fresca foliar nos permite analizar cuáles líneas presentan una mayor producción de metabolitos en las hojas, en este aspecto se destacan las líneas Nic 1016, SNN y Nic 1006, con valores alrededor de 0,7 y se presentan el resto de las líneas con valores intermedios entre 0,4 y 0,5 con excepción de la línea BHmN que muestra la menor tasa con un valor de 0,3. No obstante este aspecto es importante pero no es determinante en nuestro caso ya que centramos el interés en compuestos de la superficie de la hoja que están incluidos pero menos representados en el total de metabolitos de la hoja.

El número de hojas por planta pudiera ser un criterio a tener en cuenta cuando se quiere obtener extractos a partir de este órgano vegetal, por lo que seleccionamos para el experimento de diferentes solventes la línea Nic 1061 de mayor número de hojas, altura y valores intermedios de masa fresca y tasa de masa seca/masa fresca.

### *Experimento 1: Determinación del solvente para la obtención de los extractos crudos de exudados foliares de tabaco.*

En este experimento se logran mayores rendimientos con el uso del etanol 90%, seguido del diclorometano y al final los solventes: metanol, acetato de etilo y n-butanol sin diferencias entre ellos (figura 1 A). El incremento en la polaridad del etanol 90%, teniendo en cuenta además el 10% de agua que presenta, pudo haber contribuido a la extracción de otros compuestos más polares que no fueron extraídos con los otros solventes y estos incrementan la masa del extracto seco y por supuesto el rendimiento. Por lo que este solvente

**Tabla 1.** Indicadores morfológicos de 10 líneas de tabaco a los 70 días después del trasplante a bolsas.

| Líneas   | Masa fresca total de hojas (g) | Tasa masa seca/masa fresca de hojas | Altura de la planta (cm) | Número de hojas por planta |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Nic 1016 | 447.30 a                       | 0.64 b                              | 63.88 a                  | 19 a                       |
| BHmN     | 192.10 b                       | 0.31 f                              | 32.75 f                  | 12 c                       |
| Nic 1019 | 189.40 b                       | 0.43 de                             | 48.13 cd                 | 13 c                       |
| CE       | 145.10 c                       | 0.52 c                              | 59.75 ab                 | 13 c                       |
| SNN      | 126.00 d                       | 0.70 a                              | 68.25 a                  | 18 a                       |
| Nic 1061 | 102.00 e                       | 0.39 e                              | 65.50 a                  | 18 a                       |
| Nic 1017 | 93.70 ef                       | 0.38 e                              | 53.63 bc                 | 14 c                       |
| Nic 1006 | 86.70 f                        | 0.64 b                              | 45.13 cd                 | 13 c                       |
| Nic 1003 | 67.20 g                        | 0.47 cd                             | 41.50 de                 | 16 b                       |
| Nic 1015 | 48.80 h                        | 0.52 c                              | 34.88 ef                 | 13 c                       |

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre líneas de tabaco para cada indicador (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para  $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

puede tener la capacidad de extraer compuestos polares y menos polares.

La cromatografía en capa fina de los extractos reveló una extracción efectiva y similar de los compuestos mayoritarios en todos los casos (figura 1 B). Todos los solventes evaluados fueron capaces de extraer los compuestos mayoritarios, sin grandes diferencias en el patrón cromatográfico. En todos los extractos obtenidos con diferentes solventes se revela un compuesto A cerca del punto de aplicación y un compuesto B cerca del frente de corrida, con una mayor intensidad del compuesto A para el extracto etanólico, seguido del extracto metanólico y menor para el extracto butanólico (figura 1 B).

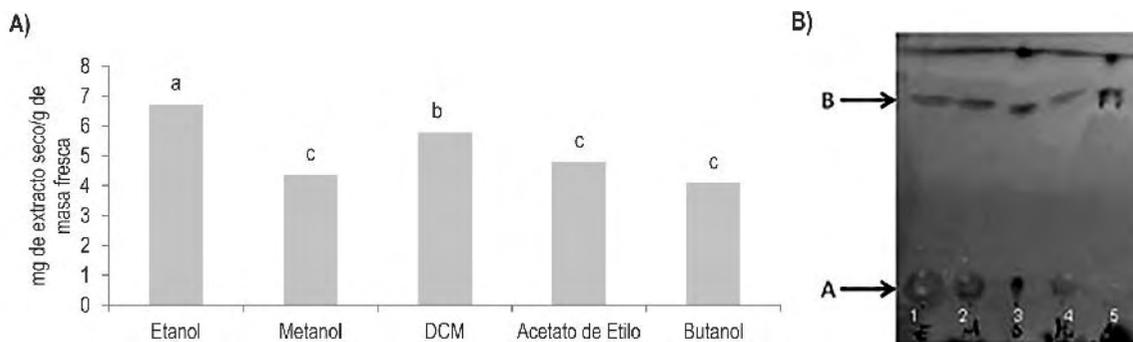
Debido a que el diclorometano se ha convertido en un factor de referencia para los lavados de las superficies foliares de tabaco, existen pocos datos publicados en la última década relacionados con la eficiencia de extracción de otros solventes para estos fines (Whitfield, 2004). Existe una mayor tendencia a utilizar el tabaco en la producción y obtención de productos naturales por lo que es determinante el desarrollo de métodos de extracción escalables.

Whitfield (2004) con el objetivo de desarrollar métodos para la producción y extracción de proteínas de la superficie foliar de tabaco transgénico también evaluó diferentes solventes y el número de lavados. Sus estudios mostraron que un mayor número de lavados de los solventes evaluados (3 lavados) puede lograr rendimientos comparables para algunos casos a los alcanzados con diclorometano. Además, demostró que la extracción individual de cada compuesto también dependía del número de lavados pero en todos los casos el 100% de la cantidad de cada compuesto se alcanzó después de los tres lavados. De forma general obtuvo los mejores resultados con n-propanol, metanol y etanol.

En este experimento los 4 lavados realizados para todos los solventes deben permitir una mayor extracción de metabolitos en general del etanol 90% en comparación con el diclorometano y el resto de los solventes en igualdad de condiciones por lo que la intensidad de los compuestos A y B representados en la cromatografía parece corresponder con el máximo para cada compuesto, lo que determina que el n-butanol no es capaz de extraer en estas condiciones iguales cantidades del compuesto B si lo comparamos con el diclorometano y el resto de los solventes evaluados. No obstante se requiere un estudio de la composición química de todos los extractos obtenidos para llegar a esta conclusión.

Es conocido además el efecto de deterioro que ocasiona en las hojas el diclorometano. En este experimento se observaron algunos daños no evaluados en las hojas tratadas con diclorometano, y en mejores condiciones las hojas tratadas con etanol 90 % lo que ha sido comprobado por Whitfield (2004) quien observó menor efecto en las condiciones de las hojas cuando se usaron solventes como etanol y metanol, medianamente afectadas las hojas tratadas con isopropanol y n-propanol y altamente afectadas las hojas tratadas con diclorometano, por lo que esto es un aspecto también a tener en cuenta en la selección del solvente si se quiere integrar el paso de extracción de los compuestos de la superficie en operaciones de bioprocesos o de análisis químico del interior de la hoja.

Teniendo en cuenta los rendimientos en los extractos secos (mayor en etanol 90 %) y la semejanza en el patrón cromatográfico de los extractos de diclorometano y etanol, y aún cuando los solventes de metanol y acetato de etilo presentan patrones similares, proponemos el empleo del etanol 90% en la obtención de los exudados foliares a partir de las diferentes líneas por ser más eficiente que el diclorometano y el resto de los solventes y teniendo en cuenta las otras consi-



**Figura 1 A.** Rendimiento de la extracción en mg de extracto seco·g<sup>-1</sup> de masa fresca foliar de los exudados obtenidos en 500 mL de los diferentes solventes: etanol 90%, metanol, DCM (diclorometano), acetato de etilo y n-butanol a partir de la línea Nic 1061 B: Cromatografía en capa fina para la separación de los extractos crudos obtenidos a partir de exudados foliares de la línea Nic 1061 con diferentes solventes. 1. Extracto con etanol 90%. 2. Extracto con metanol 3. Extracto con diclorometano 4. Extracto con acetato de etilo 5. Extracto con butanol. Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre solventes (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para p<0.05, n=6).

deraciones como que el etanol 90 % es más inocuo, más seguro, menos agresivo, de más fácil manipulación, concentración y recuperación, más disponible y más económico.

El etanol 90% se ha seleccionado para la obtención de extractos crudos para los próximos experimentos, no obstante la selección del solvente más adecuado siempre depende de los compuestos que uno pretende aislar y su actividad, por lo que es posible que el 100 % de efectividad no se logre debido a la gran diversidad de estructuras químicas presentes en la superficie de la hoja del tabaco entre diferentes genotipos, pero al menos se logra una buena representación de los compuestos mayoritarios. Es necesario comprobar la actividad de los compuestos aislados luego de la extracción.

### Experimento 2: Obtención de extractos crudos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco

Se obtuvieron los exudados foliares de tabaco a partir de diez líneas de tabaco utilizando como solvente el etanol 90%. Los extractos crudos concentrados hasta 50 mL mostraron intensidad diferente en la coloración (datos no mostrados) que correspondió con diferentes concentraciones en mg de extracto seco·mL de etanol 90% (datos no mostrados). Las líneas presentaron un rendimiento diferente entre ellas, (figura 2 A).

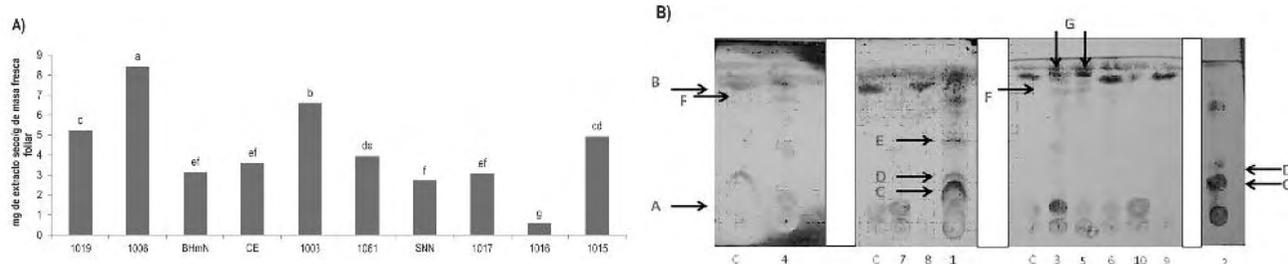
El mayor rendimiento se alcanzó con la línea Nic 1006 con valores de 8 mg de extracto seco·mg<sup>-1</sup> de masa fresca foliar, luego le siguió la Nic 1003, y luego la Nic 1019 y Nic 1015, esta última sin diferencia con la Nic 1061 cubriendo valores entre 4 y 7 mg de extracto seco·mg<sup>-1</sup> de masa fresca foliar. El rendimiento más bajo se obtuvo con la línea Nic 1016 (figura 2 A), la que a pesar de tener una gran masa fresca foliar, altura y número de hojas por planta (tabla 1) no se extrajeron grandes cantidades de componentes de la superficie foliar. Esto demuestra que los indicadores morfológicos no son determinantes en la selección de

las líneas candidatas, la composición química de las líneas está más relacionada con el factor genético. No obstante una vez detectada la capacidad genética de síntesis de los compuestos de interés, el conocimiento de los aspectos morfológicos es importante a la hora de establecer un proceso de producción.

La cromatografía en capa fina de los extractos en estas condiciones reveló una diversidad en composición química dada por la línea de tabaco, así como también la concentración de los extractos y los compuestos mayoritarios en todos los casos (figura 2 B). En la mayoría de los extractos se revela un compuesto A cerca del punto de aplicación que no aparece en los extractos (3 y 9, figura 2 B) y un compuesto B cerca del frente de corrida que no aparece en los extractos (2 y 8, figura 2 B) y Otros compuestos C y D se muestran en los extractos 4 y 6 (figura 2B). Se observa la presencia de un compuesto E en las líneas 1, 4 y 5 y de un compuesto F en las líneas, 1, 4, 5 y 6 (figura 2 B). Otro compuesto G más próximo al frente de corrida se muestran solo en los extractos 5 y 6 (figura 2 B).

Este sistema permite la separación de diferentes componentes de una muestra y mostrar la diversidad química que presentan los extractos etanólicos obtenidos, dado por la gran diversidad química característica de la familia *Solanaceae* en general y la diversidad de genotipos (Wollenweber *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2011; Tissier, 2012, Sallaud *et al.*, 2012), lo que posibilita una diversidad de aplicaciones potenciales de estos extractos. Otros métodos de cromatografía se requieren para la cuantificación e identificación de los compuestos presentes.

Aunque los metabolitos secundarios son los más frecuentemente asociados a la resistencia a enfermedades, también proteínas defensivas llamadas filoplaninas, relacionadas con la patogénesis, forman parte de la superficie foliar de hojas de tabaco y son consideradas productos de tricomas glandulares, confiriéndole



**Figura 2 A.** Rendimiento de la extracción en mg de extracto seco·g<sup>-1</sup> de masa fresca foliar de los exudados obtenidos en 500 mL de etanol 90 %: a partir de las 10 líneas B: Cromatografía en capa fina para la separación de los extractos crudos C: Se utilizó como control el extracto etanólico obtenido de la línea 1061 en el experimento 1 de diferentes solventes. 1: CE, 2: SNN, 3: Nic 1017, 4: Nic 1019, 5: BHmN, 6: Nic 10103, 7: Nic 1061, 8: Nic 1015, 9: Nic 1016, 10: Nic 1006. Se señalan con letras A-G diferentes compuestos revelados. Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre líneas de tabaco (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para p≤0.05, n=6).

resistencia a patógenos (Sheperd *et al.*, 2005). En este caso con el uso de solventes de mediana polaridad se favorece la extracción de los metabolitos secundarios mayoritarios de la superficie foliar como diterpenos y ésteres de azúcares. Debido a que las filoplaninas son compuestos polares, sólo extracciones acuosas permitirían obtener filoplaninas en los extractos, por lo que no se espera la presencia de estas en los extractos obtenidos (Sheperd *et al.*, 2005).

Todos los extractos son seleccionados para la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* contra las bacterias patógenas: *Xanthomonas campestris* y *Pectobacterium carotovorum*.

### **Experimento 3: Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de tabaco frente a bacterias fitopatógenas.**

En la determinación de la actividad antibacteriana de extractos obtenidos para la comparación de diferentes solventes frente a *Xc* y *Pc*, la línea Nic 1061 mostró su capacidad para inhibir el crecimiento de *Xc* con todos los extractos (tabla 2). Un análisis de los halos de inhibición no reveló diferencias significativas entre los extractos que provocaron una inhibición de 2,0 cm de diámetro aproximadamente. Esto evidencia dos resultados: los extractos de la línea Nic 1061 inhiben el crecimiento de *Xc* y los solventes evaluados son capaces de extraer el compuesto activo o los compuestos activos en cantidades similares.

La kanamicina utilizada como control positivo, provocó una inhibición de 3,0 cm de diámetro significativamente diferente a la de los extractos para el caso de *Xc*. Sin embargo, en el ensayo contra *Pc* no se mostró inhibición del crecimiento por los extractos, y una menor inhibición provocada por la kanamicina de aproximadamente 2,0 cm de diámetro. El uso de la kanamicina sólo nos permite en ensayos *in vitro*, lograr un indicador inhibición del crecimiento en bacterias susceptibles a ella, pero este antibiótico no es utilizado *in vivo*, además de que no es posible realizar una comparación real de su efecto con el efecto que podrían

ocasionar los extractos crudos, que se conforman por una mezcla de compuestos. Otros autores han utilizado la kanamicina y otros antibióticos en ensayos *in vitro* de antibiogramas (Pino *et al.*, 2012; Owoseni y Sangoyomi, 2014). En próximos experimentos la kanamicina podría utilizarse en concentraciones más bajas para evitar influencia de esta sobre los discos evaluados en un reducido espacio de la placa, también un menor número de discos pueden ser evaluados por placa para evitar solapamiento de halos si los productos aplicados muestran una gran inhibición del crecimiento bacteriano.

El dimetilsulfóxido utilizado para disolver los extractos secos, no mostró inhibición del crecimiento al evaluarse como control negativo lo que demuestra la no interferencia de este disolvente en los resultados obtenidos y su uso eficaz para estos experimentos.

Geetha *et al.* (2013) comprobaron que el dimetilsulfóxido resultó ser el más seguro, en una comparación entre disolventes para detectar efectos fitotóxicos y presencia de compuestos bioactivos.

La semejanza encontrada en los ensayos de inhibición para los extractos obtenidos a partir del uso de diferentes solventes apoya la idea de sustituir el diclorometano por el etanol 90 % en este propósito en particular, ya que corrobora que se han extraído los mismos compuestos que tienen propiedades antibacterianas contra *Xc*. Esta línea mostró actividad sólo para una bacteria lo cual indica que todos los extractos deben ser evaluados contra las dos bacterias y sugiere la existencia de diferentes compuestos activos para la interacción con diferentes bacterias.

En la determinación de la actividad antibacteriana de extractos obtenidos para la comparación de líneas de tabaco frente a *Xc* y *Pc* se observó que todos los extractos crudos evaluados mostraron menor halo de inhibición en comparación con la kanamicina en los ensayos de ambas bacterias (figura 3). Para el caso de *Xc* los mejores extractos se obtuvieron a partir de las líneas Nic 1019 (4), BHmN (5), Nic 1061 (7) and Nic 1016 (9), mientras que para el caso de *Pc* sólo el

**Tabla 2.** Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.), línea Nic 1061 obtenidos con el empleo de diferentes solventes contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (*Xc*) y *Pectobacterium carotovorum* (*Pc*). La zona de inhibición se determina por el diámetro expresado en centímetros (cm) e incluye el diámetro del disco (0,7cm). K: kanamicina como control positivo (500 µg).

| Bacterias | Solventes utilizados y diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cm),<br>Línea Nic 1061 |               |           |         |                  |       |
|-----------|---|---------------|-----------|---------|------------------|-------|
|           | Etanol 90%  | Diclorometano | n-Butanol | Metanol | Acetato de etilo | K     |
| X. c      | 2,1 b   | 2,2 b         | 1,7 b     | 2,1 b   | 2,1 b            | 3,0 a |
| P. c      | ni  | ni            | ni        | ni      | ni               | 2,5 a |

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre solventes y kanamicina para cada bacteria independiente. (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para  $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).

extracto de la línea Nic 1015 (8) mostró efecto inhibitorio (tabla 3) (figura 3). Entonces es posible obtener extractos activos contra estas dos bacterias utilizando solventes más comunes, menos tóxicos y más baratos que el diclorometano.

Para el ensayo de diferentes concentraciones menores a 500 µg/disc se seleccionaron los extractos de las líneas BHmN (5), Nic 1061 (7) and Nic 1016 (9) contra *X. campestris* y el extracto de la línea Nic 1015 (8) contra *P. carotovorum*. Los extractos 7 y 8 mostraron inhibición de las bacterias *X. campestris* y *P. carotovorum* respectivamente a la concentración de 5 µg/disc con diferencias significativas con concentraciones entre 300 y 500 µg/disc para la línea Nic 1061 y entre 400 y 500 µg/disc para la línea Nic 1015 (tabla 4).

Shobha y Kale (2008) encontraron extractos activos *in vitro* contra bacterias y hongos patógenos del suelo, entre ellos *Xanthomonas campestris* y *Erwinia carotovora*, pero a partir de preparaciones obtenidas de exudados de la lombriz de tierra *Eudrilus Eugeniae*.

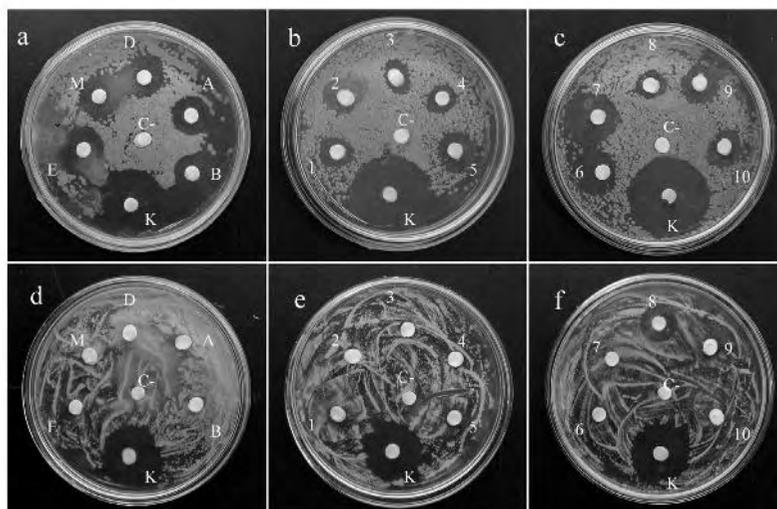
Experimentos similares se llevaron a cabo por Owo-seni y Sangoyomi (2014) en la búsqueda de solventes eficientes para obtener extractos de plantas activos contra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* que afecta a miembros de la familia *Solanaceae* y mostraron extractos más activos *in vitro* a partir del cloroformo, seguido del metanol y el etanol con diámetros del halo de inhibición entre 0,8 y 1,5 cm.

Seo *et al.* (2012) identificaron dos diterpenos naturales presentes en tabaco (esclareol y cis-abienol) que

**Tabla 3.** Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos etanólicos (500 µg) de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.) (10 líneas) contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (*Xc*) y *Pectobacterium carotovorum* (*Pc*). La zona de inhibición se determina por el diámetro expresado en centímetros (cm) e incluye el diámetro del disco (0,7cm). K: kanamicina como control positivo (500 µg).

| Líneas de tabaco evaluadas y diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cm) |       |       |          |          |       |          |          |          |          |          |       |
|--|-------|-------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| Bacterias  | CE    | SNN   | Nic 1017 | Nic 1019 | BHmN  | Nic 1003 | Nic 1061 | Nic 1015 | Nic 1016 | Nic 1006 | K     |
| <i>X.c</i>   | 1,3 c | 1,3 c | 1,4 c    | 1,7 b    | 1,7 b | 1,5 c    | 1,9 b    | 1,4 c    | 1,8 b    | 1,5 c    | 3,3 a |
| <i>P.c</i>   | ni    | ni    | ni       | ni       | ni    | ni       | ni       | 1,6 b    | ni       | ni       | 2,6 a |

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre líneas de tabaco y kanamicina para cada bacteria independiente (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para p≤0.05, n=6).



**Figura 3.** Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos crudos (500 µg) de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.) por el método difusión en agar con discos de papel de filtro contra dos bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (A, B, C) y *Pectobacterium carotovorum* (D, E, F) determinado por el halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Extractos obtenidos con cinco solventes (E: etanol 90 %, M: metanol, D: diclorometano, A: acetato de etilo, B: n-butanol) línea Nic 1061 contra *Xanthomonas campestris* (a) y *Pectobacterium carotovorum* (d). Extractos etanólicos obtenidos a partir de 10 líneas de tabaco 1: CE, 2: SNN, 3: Nic 1017, 4: Nic 1019, 5: BHmN, 6: Nic 10103, 7: Nic 1061, 8: Nic 1015, 9: Nic 1016, 10: Nic 1006 contra *Xanthomonas campestris* (b, c) y *Pectobacterium carotovorum* (e, f). K: kanamicina como control positivo 500 µg. C-: dimetilsulfóxido como control negativo.

**Tabla 4.** Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones de extractos etanólicos de exudados foliares de tabaco (*N. tabacum* L.) de líneas seleccionadas por su actividad antibacteriana contra las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (Xc) y *Pectobacterium carotovorum* (Pc). La zona de inhibición se determina por el diámetro expresado en centímetros (cm) e incluye el diámetro del disco (0,7 cm). K: kanamicina como control positivo (500 µg).

| Cantidad de extracto aplicada en cada disco de papel de filtro (µg)<br>diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano (cm) |          |       |        |        |        |        |        |        |       |       |       |
|--|----------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Bacterias  | Líneas   | 5     | 25     | 50     | 75     | 100    | 200    | 300    | 400   | 500   | K     |
| Xc   | BHmN     | ni    | 1,0 c  | 1,1 c  | 1,4 bc | 1,5 bc | 1,4 bc | 1,6 b  | 1,6 b | 1,6 b | 3,0 a |
|  | Nic 1061 | 0,9 c | 0,9 c  | 1,3 bc | 1,4 bc | 1,5 bc | 1,5 bc | 1,8 b  | 1,8 b | 1,8 b | 3,1 a |
|  | Nic 1016 | ni    | 0,8 c  | 1,2 bc | 1,3 bc | 1,5 b  | 1,6 b  | 1,5 b  | 1,5 b | 1,6 b | 2,9 a |
| Pc   | Nic 1015 | 0,8 c | 0,9 bc | 1 bc   | 0,9 bc | 1 bc   | 1,0 bc | 1,0 bc | 1,4 b | 1,4 b | 1,9 a |

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas entre concentraciones para cada línea de tabaco independiente (Anova de un factor y Tukey en un análisis estadístico realizado en SPSS para  $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).

inhibieron la enfermedad provocada por *Ralstonia solanacearum* en plantas de tabaco, tomate y *Arabidopsis* después de aplicado el producto a las raíces sin haber mostrado actividad antibacteriana. Lo que sugiere que es posible que los terpenos presentes en los extractos crudos estén involucrados en la respuesta antibacteriana pero según el mecanismo de acción estos podrían servir como inductores de defensa en la planta aun cuando no hayan mostrado una inhibición directa del crecimiento bacteriano.

La selección de candidatos para obtener extractos crudos que tengan efecto inhibitorio sobre las bacterias fitopatógenas de interés se basa como primer criterio, en que estos extractos etanólicos muestren un efecto inhibitorio *in vitro* de los patógenos. Otros criterios a tener en cuenta es que la planta, en el proceso de extracción, presente grandes rendimientos de los metabolitos en general, así como también algunos indicadores morfológicos que pudieran guardar relación con la síntesis del producto natural. Sin embargo, aun cuando el número de hojas es de los más bajos y los rendimientos son intermedios, según nuestros resultados para el control de *P. carotovorum* el extracto obtenido de la línea Nic 1015 se selecciona como candidato potencial por ser el único que mostró una evidente inhibición del crecimiento de la bacteria. Para el caso de *X. campestris*, cuatro extractos muestran similar efecto inhibitorio, por lo que este criterio en combinación con los resultados en número de hojas, y rendimiento, nos lleva a la selección de la línea Nic 1061 con mayor número de hojas y rendimiento intermedio. No obstante las líneas Nic 1019, BHmN y Nic 1016 también pueden considerarse como candidatos potenciales para la obtención de exudados foliares etanólicos en el control de *X. campestris*. Una combinación de un solo producto a partir de estos extractos seleccionados pudiera dar un buen resultado en el control de ambas bacterias.

## Conclusiones

Se seleccionó el etanol 90% como mejor solvente para la obtención de extractos crudos provenientes de exudados foliares de tabaco y se obtuvieron extractos crudos etanólicos a partir de exudados foliares de líneas de tabaco que mostraron una diversidad química en cuanto a concentración, composición y rendimiento, además de actividad antibacteriana *in vitro* contra las bacterias fitopatógenas evaluadas: *X. campestris* y *P. carotovorum* para algunos casos. Estos resultados sugieren el uso potencial de los extractos etanólicos obtenidos a partir de las líneas Nic 1061 y Nic 1015 como mejores candidatos contra *X. campestris* y *P. carotovorum* respectivamente como un efectivo agente para la protección de cultivos, previa evaluación en condiciones *in vivo* en invernadero y en campo como alternativa al uso de bactericidas químicos para la protección de cultivos de interés agrícola.

## Referencias bibliográficas

- Akers, C. P., Weybrew, J. A., y Long, R. C. (1978). Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi. *American Journal of Botany*, 65, 282-292.
- Amme, S., Rutten, T., Melzer, M., Sonsmann, G., Vissers, J.P.C., Schlesier, B., y Mock, H. P. (2005). A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, 5, 2508-2518.
- Bailey, J. A., Burden, R. S., y Vincent, G. G. (1975). Capsidiol: An antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana clevelandii* following infection with tobacco necrosis virus. *Phytochemistry*, 14, 597.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., y Cuca L.E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26 (1), 97-106.
- Chang, S. Y., y Grunwald, C. (1980). Structural organization of tobacco leaf polar cuticular lipids. *Botanical Gazette*, 141(4), 360-365.
- Commission Regulation (EU) No 276/2010 of 31 March 2010. Official Journal of the European Union, L 86/11. Consultado el: 02-07-2014.

- Cristanini, G. (1995). La producción de posturas en sistemas flotantes (float system)/ hidropónicos. *L' informatore agrario/ supplemento*. 51 (5), 43-53.
- Cui, H., Zhang, S., Yang, H., Ji, H., y Wang, X. (2011). Gene expression profile analysis of tobacco leaf trichomes. *BMC plant biology*, 11:76.
- Cutler, H. G., Severson, R. F., Cole, P. D., Jackson, D. M., y Johnson, A. W. (1986). Secondary metabolites from higher plants in M.B. Green and P.A. Hedin (eds.). *Natural Resistance of Plants to Pests: Roles of Allelochemicals. American Chemical Society Symposium Series No. 296*, Washington, D.C. 178-196.
- Eklund, A. M., Forsblom, I., Berg, J. E., Damberg, C., y Wahlberg, I. (1998). Tobacco chemistry. Four new cyclized cembranoids from tobacco. *Acta Chemica Scandinavica*, 52, 1254-1262.
- Geethaa, S., Thavamany, P. J., Chiew, S. P., y Thong, O. M. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4 (4), 179-182.
- International Labour Organization (ILO). (2005). International Occupational Safety and Health Information Centre (CIS). International Chemical Safety Cards [en línea]. [Geneva, Switzerland]: abril 2000; actualizado abril 2005 [citado julio de 2007]. DICHLOROMETHANE. <http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtash/index.htm>. Consultado 07-07-14.
- Jackson, D. M., Chorlyk, O. T., Stephenson, M. G., Johnson, A. W., Harlow, C. D., Simmons, A. M., y Sisson, V. A. (1998). Potential of *Nicotiana* species for production of sugar esters. *Tobacco Science*, 42 (1), 1-9.
- Lara, F. M., y Landero N. (2012). Químicos vegetales: alternativa contra los agentes patógenos. *Cienc. hombre*, XXV (1). Enero-Abril.
- Lin, Y., y Wagner G. J. (1994). Rapid and simple method for estimation of sugar esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1709-1712.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S., Machado, M., Toth, I., Salmond, G., y Foster, G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.
- Martínez, S., Terrazas, E., Álvarez, T., Mamani, O., Vila, J., y Mollinedo, P. (2010). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *baccharis* sobre fitopatógenos, *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 13-18.
- Ohnishi, A., Chinju, M., y Katö, K. (1983). Isolation and characterization of cuticular polyester from the leaf of *Nicotiana tabacum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(5), 975-981.
- Owoseni, A. A., y Sangoyomi, T. E. (2014). Effect of Solvent Extracts of Some Plants on *Ralstonia solanacearum*. *British Microbiology Research Journal*, 4(1), 89-96.
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M.M, Abreu, Y., y Correa, T.M. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Revista Protección Vegetal*. 27 (3), 181-187.
- Reuveni, M., Tuzun, S., Cole, J. S., Siegel, M. R., Nesmit, W. C., y Kué, J. (1987). Removal of duvatrienediols from the surface of tobacco leaves increases their susceptibility to blue mold. *Physiological and molecular plant pathology*, 30(3), 441-451.
- Rossberg, M., Lendle, W., Pfeleiderer, G., Tögel, A., Dreher, E. L., Langer, E., Rassaerts, H., Beck, U., Lipper, K. A., Torkelson, T.R., Löser, E., Beutel, K. K., y Mann, T. (2006). "Chlorinated Hydrocarbons" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim. doi:10.1002/14356007.a06\_233.pub2.
- Sallaud, C., Giacalone, C., Topfer, R., Goepfert, S., Bakaher, N., Rosti, S., y Tissier, A. (2012). Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene Z-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *The Plant Journal*, 72(1), 1-17.
- SCOEL recommendations from The Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) for Methylene Chloride (Dichloromethane). SCOEL/SUM/130, June (2009). European Commission Employment, Social Affairs & Inclusion Health and Safety at work. p. 38. Consultado 22-07-2014.
- Seo, S., Gomi, K., Kaku, H., Abe, H., Seto, H., Nakatsu, S., Neya, M., Kobayashi, M., Nakaho, K., Ichinose, Y., Mitsuhashi, I., y Ohashi, Y. (2012). Identification of Natural Diterpenes that Inhibit Bacterial Wilt Disease in Tobacco, Tomato and Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 53(8), 1432-1444.
- Severson, R. F., Arrendale, R. F., Chorlyk, O. T., Johnson, A. W., Jackson, D. M., Gwynn, G. R., Chaplain, J. F., y Stephenson M. G. (1984). Quantitation of the major cuticular components from green leaf of different tobacco types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3), 566-570.
- Shepherd, R. W., Bass, W. T., Houtz, R. L., y Wagner, G.J. (2005). Phytoplanins of Tobacco Are Defensive Proteins Deployed on Aerial Surfaces by Short Glandular Trichomes. *The Plant Cell*, 17(6), 1851-1861.
- Shobha, S. V., y Kale, R. D. (2008). *In vitro* Studies on Control of Soil-Borne Plant Pathogens by Earthworm *Eudrilis Eugeniae* Exudates. *Green Pages*. <http://www.eco-web.com/edi/080106.html>. Consultado 26-01-2014.
- Tissier, A. 2012. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags?. *The Plant J.*, 70(11), 51-68.
- USDHHS. US Department of Health and Human Services. Toxicological Profile for Methylene Chloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. September (2000). Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. p. 269. Consultado 16-07-2014.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E. F. A., y Smânia, A. Jr. (2007). Screening Methods to determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Wagner, G. J. (1991). Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiology*, 96(3), 675-679.
- Wagner, G. J. (1999). Leaf Surface Chemistry In Tobacco: Production, Chemistry, and Technology; D. L. Davis and M. T. Nielsen, eds.; *Blackwell Science*: Cambridge, p. 292- 303.
- Wagner, G. J., Wang E., y Shepherd R. W. (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, 93(1), 3-11.
- Wang, E., Wang, R., Deparasis, J., Loughrin, J.H., Gan, S., y Wagner, G. J. (2001). Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nature biotechnology*, 19(4), 371-374.
- Wang, E., Hall, J. T., y Wagner, G. J. (2004). Transgenic *Nicotiana tabacum* L. with enhanced trichome exudate cembratrieneols has reduced aphid infestation in the field. *Molecular Breeding*, 13, 49-57.
- Whitfield, M. B., (2004). Integrated Bioprocessing of Native and Engineered Components from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Thesis for the Degree of Master of Science in the Crops Science, Department at North Carolina State University.
- Wollenberg, E., Dörsam, M., Dörr, M., Roitman, J. N., y Valant-Vetschera, K. M. (2005). Chemodiversity of Surface Flavonoids in *Solanaceae*. *Zeitschrift für Naturforschung C-Journal of Biosciences*, 60(9-10), 661-670.

# Obtención de semilla biotecnológica de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de alta calidad genética y fitosanitaria en el Ecuador

## Obtainment of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) biotechnological seed of high genetic and phytosanitary quality in Ecuador

Ana C. Arellano-Litardo\*, Sofía B. Korneva\*, \*\*†, Fanny C. Fischer\*, Nataly A. Tola\*, Miguel Ramos-Leal\*\*\* y Astolfo Pincay-Flores\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50710

A la memoria de Sofía B. Korneva, quien entregó parte de su esfuerzo al desarrollo de la Biotecnología de la caña de azúcar en el Dpto. BioPlantas del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) en La Habana, Cuba, así como en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) perteneciente a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y en el Centro de Investigación y Desarrollo de la Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE).

### Resumen

Los métodos de saneamiento de plantas se basan fundamentalmente en el empleo combinado de cultivo *in vitro* de meristemas con tratamientos mediante hidrotermoterapia. Este trabajo se realizó con el objetivo de obtener plantas para usar como semilla libre de patógenos sistémicos, con énfasis en la enfermedad raquitismo de los retoños de la caña de azúcar (RSD). El trabajo se llevó a cabo con diferentes cultivares de caña de azúcar, los cuales fueron previamente identificados mediante marcadores bioquímicos basados en los patrones electroforéticos de isoenzimas peroxidadas. El saneamiento se realizó en tres etapas sucesivas mediante tratamiento hidrotérmico a 52 °C durante 2h y uso del fungicida vitavax, un segundo tratamiento hidrotérmico a los meristemas a 51 °C durante 10 min y una tercera etapa donde las vitroplántulas se propagaron en presencia del antibiótico gentamicina. La detección de RSD se efectuó mediante el empleo de la técnica de tinción de haces vasculares funcionales. Los resultados permitieron la creación de un banco de germoplasma de plantas libres de los principales patógenos bacterianos sistémicos y con alta calidad genética, lo que aportó semilla básica de excelente calidad para establecer semilleros. La conservación incluyó el mantenimiento de plántulas *in vitro* y la creación de un "banco de ADN" que permite conservar el genofondo en condiciones de laboratorio. Se propone finalmente una metodología para la obtención de plantas saneadas a partir de yemas y meristemas.

**Palabras clave:** *Saccharum* spp.; saneamiento; cultivo de yemas; meristemo.

**Abreviaturas:** BAP: 6-benzyl-aminopurina; LSD: Escaldadura foliar; RSD: Raquitismo de los retoños; VMCA: Virus del mosaico de la caña de azúcar; THV: tinción de los haces vasculares;

### Abstract

Methods for obtaining healthy plants are mainly based on the combined use of meristem *in vitro* culture and hydrothermotherapy. This work was carried out in order to obtain free- pathogen plants for using as seeds, emphasizing ratoon stunting disease (RSD) of sugarcane. The work was performed using a group of sugarcane cultivars, which was confirmed the variety identification by means of peroxidases isozymes electrophoretic patterns. Plant sanitation was performed in three successive steps by means of hydrothermal treatment at 52 °C during 2h and using the fungicide vitavax, a second

\* Centro de Investigación y Desarrollo, Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE). Cantón El Triunfo, vía Durán- Tambo km 53, Guayas, Ecuador.

\*\* Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador. †. Fallecida el 7 de septiembre de 2013.

\*\*\* Laboratorio de Biotecnología, Dpto. Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana (UH), Cuba Dirección actual: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Ave. 7ma. No. 3005 e/30 y 32, Miramar, La Habana, Cuba. Telf. (53-7)2025526 fitopatologia18@iift.cu.

\*\*\*\* Presidente UNCE. A quien debe dirigirse la correspondencia uncecnicultoresecuador@hotmail.com.

hydrothermal treatment at 51 °C during 10 min to the meristem and a third step in which vitroplantlets were propagated in presence of the antibiotic gentamicin. RSD detection was done by using the staining transpiration methods (STM) of functional bundles. Results allowed the creation of a germoplasm bank of sugarcane plants free of the most important systemic bacterial pathogens, with high genetic quality, which provided basic seed of excellent quality for establishing seedlings. Conservation included an *in vitro*-plantlets bank and the creation of a "DNA bank" which allows preserving the genetic fond in laboratory conditions. Finally a methodology for obtaining free-pathogens plants from buds and meristems is included.

**Key words:** *Saccharum* spp.; plant sanitation; culture of buds; meristem.

**Recibido:** noviembre 28 de 2014

**Aprobado:** abril 24 de 2015

## Introducción

La conservación y el mantenimiento de los recursos genéticos de un país, además de ser un derecho soberano, es una necesidad que permite la manipulación sobre el germoplasma de un cultivo en cuestión.

El término germoplasma se refiere al material que se conserva como semillas, cultivo de tejido o plantas establecidas en colecciones de campo que reúne la variabilidad genética intra-específica de los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo. Existen diferentes formas de conservar el germoplasma de un cultivo. Se destacan entre ellas, la conservación *in situ* en bancos, colecciones o jardines, la conservación de tejidos y plantas en medios de cultivos *in vitro* y la crio-conservación, técnica que cobró desarrollo con el advenimiento de las técnicas de cultivo de tejido vegetal *in vitro*. De estos métodos, la conservación *in situ* en bancos es la forma más común, extendida y fácil de llevar a cabo (Demey, 2008).

En aras de resolver las necesidades crecientes de alimento, el hombre ha logrado incrementar las producciones de los diferentes cultivos agrícolas de interés. En este afán, el mejoramiento de las especies vegetales para casi todos los cultivos de interés económico ha conllevado el uso reiterado de las mejores variedades, cepas o líneas en trabajos de mejora genética. Esto ha causado que muchas de las variedades obtenidas estén emparentadas entre sí, lo que provoca una estrecha base genética. Una forma de resolver esta situación es el empleo de diversas formas genéticas cercanas a la especie en cuestión, que aportan rusticidad en dicho proceso de mejora genética.

En la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) como en la mayoría de las especies comerciales cultivadas, los híbridos modernos poseen una estrecha base genética (Costet *et al.*, 2012). Uno de los objetivos de todo programa de mejoramiento genético es precisamente ampliar esa base genética. En tal sentido, la conservación del fondo genético (genofondo) es tarea de primer orden (Min Agricultura España, 2014).

El establecimiento de un banco de semilla biotecnológica certificada es una necesidad para disponer de plantas genéticamente identificadas y libres de enfer-

medades para su posterior multiplicación con fines comerciales, de investigación y mejoramiento genético. Por el contrario, la propagación de plantas no tratadas, favorece la aparición de otros focos de infección, lo cual puede provocar epifitias y daño ambiental. Para el caso del Ecuador, la enfermedad "raquitismo de los retoños" (RSD) causada por la bacteria *Leifsonia xili* ssp. *xili* Davis resulta una de las principales enfermedades sistémicas de interés para la caña de azúcar.

El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de los tratamientos que permitan obtener un material inicial de caña de azúcar bien identificado y libre de enfermedades sistémicas para su posterior propagación acelerada, que permita el montaje de un pequeño banco de germoplasma sano en un plazo relativamente breve.

## Materiales y métodos

El trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo perteneciente a la Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE), ubicado en el Cantón El Triunfo km. 53 Vía Duran Tambo, cuenca baja de la Provincia del Guayas, sector Agua Santa, con una temperatura promedio anual de 25°C, precipitación media anual de 1202,2 mm, humedad relativa del 80,1% y una altura de 60 msnm, la más importante región azucarera del país.

## Identificación de cultivares

Se emplearon un total de ocho cultivares de caña de azúcar de 7-9 meses de edad, de los más empleados en el Ecuador. Estos fueron previamente identificados mediante caracteres morfológicos: Ragnar, CC85-92, RD75-11, CR74-250, BJ70-46, C87-51, SP70-1143 y Mex64-1487. En este trabajo se confirmó la identificación mediante el empleo de isoenzimas peroxidadas, como describen Arellano *et al.* (2012). Se escogieron hojas +3 de plantas adultas de cada cultivar empleada y se maceraron en Nitrógeno líquido. Luego se añadió una solución que contenía sacarosa 20% y 0,025% dietil-ditiocarbamato de sodio (DECA). La electroforesis en condiciones nativas se realizó empleando un sistema de corrida vertical, usando un gel de separación de poli-acrilamida de 8,5 %, con un tampón de corrida de Tris-Glicina 0,04 M a pH 8,3. El método de

tinción se basó en el empleo de o-dianisidina, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno.

### **Primera etapa de saneamiento del material vegetal**

El material vegetal procedente de los cultivares de la caña de azúcar empleados en este trabajo estaba vigoroso y sin síntomas visibles de las principales enfermedades. Las estacas, con yemas laterales del tercio medio del tallo, se cortaron empleando herramientas desinfectadas con alcohol etílico al 70% y se lavaron cuidadosamente con agua corriente y detergente, sin afectar la integridad de las yemas laterales. Estas yemas se colocaron en un baño de agua caliente a 52 °C por 2 h. Después de realizar la hidrotermoterapia, las yemas se colocaron esta vez en un baño de agua helada para detener el tratamiento y puestas en una solución del fungicida vitavax® 2 g.L<sup>-1</sup> para su desinfección. Luego de 20-25 min las yemas se incubaron a 37 °C por 12-15 días para su germinación, cubiertas con gasa y algodón humedecidos. El mantenimiento se realizó cada 48 h. Las yemas germinadas se sembraron en pequeñas fundas plásticas negras que contenían un sustrato estéril compuesto por tierra- cascarilla de arroz (tamo)-cachaza- arena en las proporciones 2:1:1:1. Luego se aplicó formol al 2% durante 15 días, aplicando posteriormente el riego diario a este material. Estas yemas germinadas en condiciones controladas se trataron con el fungicida oxiclورو de cobre 2,5 g.L<sup>-1</sup> junto al bactericida sulfato de cobre 0,5 mg.L<sup>-1</sup> una vez por semana.

### **Segunda etapa de saneamiento de plantas de caña de azúcar y establecimiento del cultivo in vitro**

A los 3-4 meses después de haber sembrado las yemas saneadas en el invernadero, los verticilos apicales de las plantas que poseían 2-3 nudos visibles, se emplearon para la obtención de los meristemos apicales. Para ello se realizó la desinfección del cogollo y los meristemos apicales cubiertos con 2-3 hojas primordiales inmaduras (generalmente de color amarillento), de un tamaño de hasta 4 mm de altura y 1-2 mm de base, se extrajeron y colocaron en tubos de ensayo que contenían 10 ml de agua estéril calentada a 51 °C. Diez minutos después, la hidrotermoterapia de los meristemos se interrumpió bruscamente y se colocaron los tubos con los meristemos en agua fría a 4 °C con agitación. Las condiciones asépticas en el medio de establecimiento se mantuvieron en presencia de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzyl-aminopurina (BAP), donde permanecieron de 15 a 20 días a temperatura de 26-28 °C y 6000 lux de iluminación. Posteriormente, los cultivos se sembraron en el medio de multiplicación en presencia de BAP hasta lograr su establecimiento. Esta hormona solamente se añadió en la etapa de multiplicación.

### **Tercera etapa de saneamiento de diferentes cultivares de caña de azúcar**

Una vez establecido el cultivo, las vitroplántulas se sembraron en el medio de propagación en presencia del antibiótico gentamicina 50 mg.L<sup>-1</sup>, donde permanecieron durante 7 días. Luego las plantas se sembraron en el medio de enraizamiento en presencia de altas concentraciones (20-30 g.L<sup>-1</sup>) de sacarosa y ácido 3-indol acético (AIA) (1-6 mg.L<sup>-1</sup>), eliminando las que mostraron hojas amarillentas provocadas por efecto del antibiótico y que no presentaban buenas características después del tratamiento. Las vitroplantas propagadas después de la segunda etapa de tratamiento se utilizaron para la extracción de micromeristemos, los cuales tenían dimensiones entre 0,5 a 0,8 mm bajo el microscopio estereoscópico. Una vez obtenida la cantidad de plantas necesarias, se procedió al enraizamiento y pase a fase I de aclimatización (invernadero). En todos los casos, los medios de cultivo sintéticos empleados tuvieron como base el medio descrito por Murashige y Skoog (1962), con las modificaciones descritas por Korneva *et al.* (1986).

Aunque se partió de plantas sanas sin síntomas evidentes de enfermedad, en cada etapa de saneamiento se evaluó la presencia de la enfermedad "raquitismo de los retoños" (RSD), en las plantas usadas como material de partida de las yemas y posteriormente en las plantas adultas obtenidas por meristemos derivadas de estos tratamientos. El análisis de confirmación empleado para el diagnóstico de la enfermedad "raquitismo de los retoños" fue el método presuntivo previamente descrito en la literatura, basado en la transpiración del tejido vegetal y el conteo de haces vasculares funcionales y no funcionales (Chagas y Tokeshi, 1994). Para ello se tomaron al azar 10 tallos adultos por réplica de cada plantón seleccionado del cultivar en estudio y se cortaron a nivel del suelo, dejando las hojas fisiológicamente activas de cada variedad a evaluar. Para la tinción de los haces vasculares los tallos se sumergieron en una solución de safranina (1,25% p/v) durante una hora y después se retiraron y dejaron secar. A partir del segundo entrenudo basal se sacaron láminas (rodajas) de 10 mm de diámetro, que se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego se observaron en un estereomicroscopio marca Boeco para el conteo de los haces funcionales y no funcionales, los cuales se identificaron por la presencia de una coloración rojiza o parda, respectivamente. También se usó un microscopio óptico Fischer Scientific modelo Micromaster con cámara acoplada y un objetivo con 40 aumentos para el conteo de los haces vasculares funcionales y no funcionales. Con esos resultados se calculó el porcentaje de vasos funcionales (VF) y no funcionales (VNF) según Harrison y Davis (1988), según la ecuación: % VF= VF/VT x 100% y VNF= VNF/VT x 100%, donde VT es el total de vasos evaluados.

Adicionalmente, se determinó la presencia de síntomas correspondientes a la enfermedad sistémica escaldadura foliar, causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson).

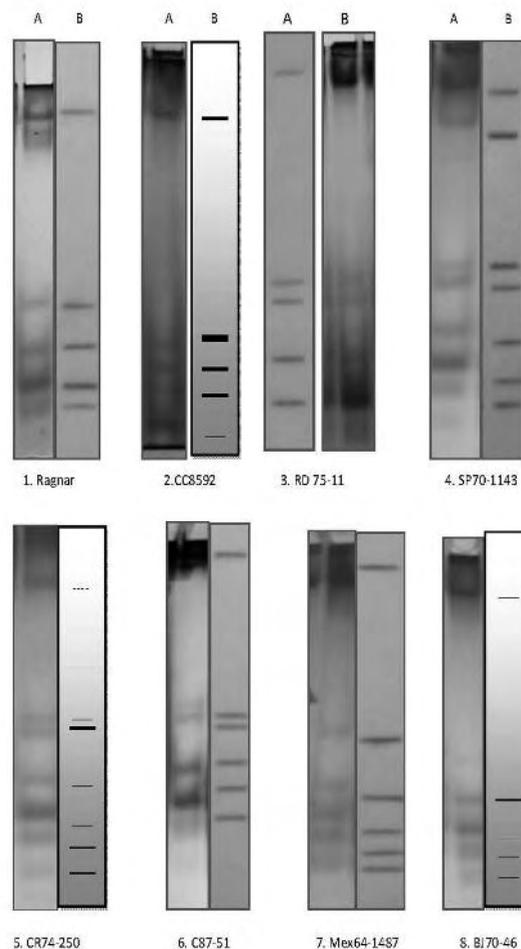
Para la creación del banco de ADN, se llevó a cabo la extracción del material genético de acuerdo a lo descrito por Doyle y Doyle en 1983.

## Resultados y discusión

La identificación de los cultivares utilizados mediante los patrones de isoenzimas peroxidadas se muestra en la figura 1. El patrón electroforético de cada cultivar resultó único, como había sido descrito anteriormente (Arellano *et al.*, 2012). La importancia de la identificación de los cultivares obedece al hecho de evitar la presencia de mezclas varietales en los campos, situación que puede producir disminución en los rendimientos o la posibilidad de ataques inesperados por patógenos en cultivares que son resistentes, pero mezclados con otro que puede ser susceptible.

Los caracteres agro-morfológicos descritos anteriormente están conformados por características fenotípicas de fácil identificación visual o medición tales como: color y altura del tallo, forma de la yema y de los entrenudos, rendimiento, susceptibilidad o resistencia a stress hídrico, plagas o enfermedades. Estos caracteres se definen como “*descriptores*” para cada cultivo y son aprobados por los organismos internacionales encargados de ello.

En el caso de los caracteres bioquímicos y moleculares, los descriptores estarán conformados por la expresión genotípica a través del patrón multi-banda observado para cada individuo después de su visualización mediante electroforesis de proteínas o de productos de amplificación de la molécula de ADN. Debe señalarse que en términos de bancos de germoplasma, los marcadores bioquímicos y moleculares se han convertido en uno de los descriptores más útiles y más empleados de los últimos tiempos. En este sentido, la figura 1 constituye el descriptor bioquímico empleado para el manejo de las variedades en estudio y que fue el



**Figura 1.** Patrones de electroforesis de isoenzimas peroxidadas de los cultivares de caña de azúcar empleados en este trabajo. A) patrón de electroforesis de isoenzimas peroxidadas; B) zimograma correspondiente al patrón electroforético obtenido. Cultivar: 1: Ragnar; 2: CC85-92; 3: RD75-11; 4: SP70-1143; 5: CR74-250; 6: C87-51; 7: Mex64-1487; 8: BJ70-46

empleado en este trabajo. Puede apreciarse que todos los patrones isoenzimáticos distinguen a cada cultivar en estudio.

**Saneamiento y multiplicación de variedades de caña de azúcar destinadas para el establecimiento del banco germoplasma certificado**

Con relación al saneamiento, durante el mantenimiento de las yemas tratadas, éstas se observaron detenidamente y se eliminaron los hongos que crecieron sobre la superficie, mediante el uso de algodón humedecido con alcohol. La gasa húmeda usada como soporte de las yemas, permitió mantener la humedad relativa del sistema. El lavado de las yemas laterales del tercio medio del tallo presente en las estacas, permitió un elevado nivel de desinfección sin afectar la integridad de dichas yemas. Los tratamientos semanales con el fungicida oxiclورو de cobre junto al bactericida sulfato de cobre, permitieron también estos altos índices de desinfección.

**Tabla 1.** Porcentaje de germinación de los cultivares de caña de azúcar en estudio luego del tratamiento térmico a 52 °C

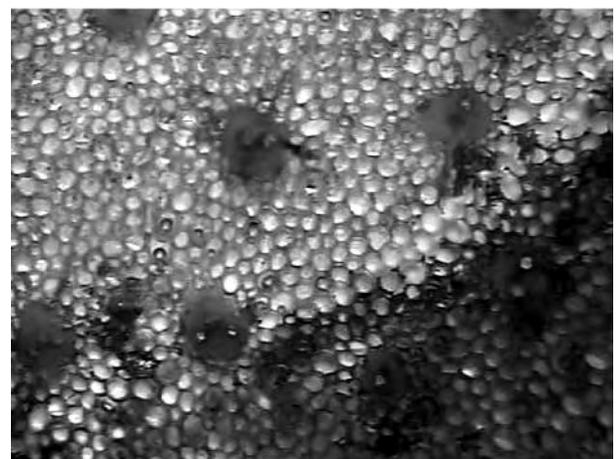
| Cultivar    | Tratamiento yemas a 52°C |             |               |
|-------------|--------------------------|-------------|---------------|
|             | Total                    | Germinación | % germinación |
| Ragnar      | 48                       | 37          | 77.0          |
| CC85-92     | 43                       | 34          | 79.0          |
| RD75-11     | 47                       | 36          | 76.5          |
| CR74-25O    | 42                       | 25          | 59.5          |
| BJ70-46     | 53                       | 41          | 77.3          |
| C87-51      | 41                       | 27          | 95.8          |
| SP70-1143   | 38                       | 29          | 76.3          |
| Mex 64-1487 | 52                       | 31          | 59.6          |

Las yemas sembradas en el sustrato estéril, mostraron diferentes porcentajes de germinación (tabla 1). Se observa que los porcentajes de germinación van desde 59,6% para el cultivar Mex64-1487 hasta 79% para CC85-92 y 95,8% para C87-51. Se conoce que los aumentos de la temperatura de tratamiento provocan disminución de la germinación de las yemas y la supervivencia de las plantas, pero trabajar a temperaturas inferiores no favorece el proceso de desinfección y saneamiento. Varios autores no lograron germinación de las yemas a los tratamientos de 50,5 °C durante 3 h (Chagas y Tokeshi, 1994). Pérez et al., (1998) informaron entre 30–44 % de germinación utilizando un

tratamiento de 50,5 °C por 2 h sobre propágulos de una yema de diferentes tamaños y en diversos cultivares. China y Pérez (1997) obtuvieron 30% de germinación después de aplicar similar tratamiento a yemas individuales. Pérez y Mauri (1986) solo alcanzaron un 20% de brotación de yemas tratadas a 50 °C durante 2 h. En ese sentido, los resultados de este trabajo mostraron valores de mortalidad mucho más bajos que los informados con anterioridad. Con respecto al saneamiento, no se observó la presencia de síntomas de RSD.

El principal objeto de saneamiento en la caña de azúcar en el Ecuador es la eliminación de la bacteria *L. xyli* ssp. *xyli*, aunque se ha descrito una disminución de esta enfermedad en el país (CINCAE, 2011). El diagnóstico, basado en el método presuntivo de tinción de los haces vasculares, descrito previamente por Chagas y Tokeshi (1994), es menos efectivo que otros informados, pero es de fácil desarrollo para un diagnóstico rápido. Aunque en muchos de los trabajos citados se partió de material enfermo para confirmar el saneamiento, en nuestro caso las plantas empleadas se encontraban vigorosas y libres de síntomas (figura 2). Es necesario mencionar que la metodología empleada no es la más moderna ni sensible para la detección de la bacteria. Por ello, puede haber falsos negativos dados por ejemplo por las bajas concentraciones bacterianas

Varios trabajos sobre esta temática realizaron el diagnóstico basado en el análisis dot-blot y por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Hernández et al., (1997) detectaron presencia de RSD, por lo que el tratamiento térmico no resultó efectivo en ningún caso para la eliminación de *L. xyli*. Ramallo y de Ramallo (2001) coincidieron con esos informes, donde no lograron saneamiento a RSD con el tratamiento hidrotérmico



**Figura 2.** Haces vasculares funcionales (sanos) del cultivar de caña de azúcar CC85-92. Obsérvese la coloración rojiza correspondiente a la tinción empleada. En la parte inferior izquierda la flecha indica un vaso dañado.

a 50,5°C durante 2h, aplicado a propágulos de una yema, aunque lograron la atenuación de la bacteria. Resultados similares obtuvieron Pérez *et al.*, (1998), quienes no consiguieron erradicar el patógeno empleando igual tratamiento, aunque si se disminuyó la concentración de células de la bacteria. Algunos de estos tratamientos no resultaron efectivos debido a diversas causas. Iglesia *et al.* (2007a) observaron dispersión en los datos de las diferentes determinaciones de cada variedad lo que podía atribuirse a la respuesta individual de cada planta y según el genotipo empleado. Esto obliga a que las evaluaciones abarquen un número superior de muestras, que las establecidas. Otra causa podía ser el número insuficiente de tratamientos. Algunos autores han planteado la necesidad de realizar como mínimo tres tratamientos sucesivos de hidrotermoterapia a semilla comercial, además de aplicar las medidas de control adecuadas, para poder controlar eficientemente el RSD. Se ha determinado también que un solo tratamiento no logra la inactivación total del organismo causal de la enfermedad (China y Pérez, 1997; Piñón, 2001). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que tratamientos sucesivos también disminuyen el porcentaje de germinación de las yemas.

En el presente trabajo, aunque no fue un objetivo esencial, tampoco se detectaron síntomas de la enfermedad sistémica Escaldadura foliar, causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson). Hay que destacar que el cultivar CC85-92, uno de los de más rápido crecimiento entre los cañicultores en el Ecuador, es susceptible a esta enfermedad. Por tanto, la aplicación de estas técnicas de saneamiento, en combinación con la aplicación de la micropropagación acelerada mediante cultivo *in vitro* de meristemos, Arellano *et al.*, (2009) evidencian una disminución de

la incidencia de estas dos enfermedades bacterianas sistémicas.

### Segunda etapa de saneamiento de plantas de caña de azúcar y establecimiento de cultivo *in vitro*

El saneamiento de los verticilos apicales de plantas de 3- 4 meses provenientes de las yemas saneadas en el invernadero, se muestra en la tabla 2. La tabla muestra el número de meristemos a los que se les realizó termoterapia, de estos los que sobrevivieron al salir de P0 y su porcentaje, luego los que pasaron a P1 y sobrevivieron y finalmente en P2 el total de brotes obtenidos. Puede apreciarse que los porcentajes de supervivencia van desde 65,6% para el cultivar Mex64-1467 hasta 96% para C87-51 en el primer pase. Este comportamiento evidencia la dependencia del cultivar con relación a la supervivencia.

En las técnicas de cultivo *in vitro* de tejido, la mayor pérdida del material vegetal ocurre en los primeros pases P0 y P1 por el establecimiento del cultivo. A partir de P2 esto disminuye, pues la planta se ha formado completamente. Por esa razón se evaluó el porcentaje de supervivencia en P0 y P1.

A pesar de los controles en las condiciones experimentales, no fue posible disminuir las pérdidas ocasionadas en esta etapa. Las excesivas manipulaciones del material vegetal (manejo de instrumentos, calor excesivo, corte inadecuado del meristemo) pudieran ser algunas de las causas de las pérdidas. Estas pérdidas en la supervivencia no pueden vincularse a una reducción de la masa seca, la cual está asociada a la presencia de brotes hiperhídricos. Según Kevers *et al.* (2004), la hiperhidricidad implica problemas de diferenciación celular, por lo que los brotes no pueden tener un de-

**Tabla 2.** Tratamiento térmico a meristemos de los cultivares de caña de azúcar en estudio provenientes de las yemas tratadas.

| Cultivar    | Termoterapia (51°C) | Supervivencia (%) |      |             |       |             |
|-------------|---------------------|-------------------|------|-------------|-------|-------------|
|             | Meristemos          | P0 (brotes)       | %    | P1 (brotes) | %     | P2 (brotes) |
| Ragnar      | 37                  | 30                | 81   | 26          | 80    | 37          |
| CC85-92     | 34                  | 29                | 90   | 20          | 68.9  | 20          |
| RD75-11     | 36                  | 27                | 75   | 21          | 77.7  | 21          |
| CR74-25O    | 33                  | 25                | 76   | 19          | 76    | 48          |
| BJ70-46     | 41                  | 28                | 68   | 19          | 68    | 35          |
| C87-51      | 27                  | 25                | 96   | 23          | 92    | 22          |
| SP70-1143   | 29                  | 23                | 79   | 20          | 86    | 20          |
| Mex 64-1487 | 31                  | 21                | 65.6 | 18          | 85.71 | 26          |

sarrollo morfo-fisiológico normal. Este fenómeno que no ha sido dilucidado completamente ha sido descrito como un desorden multicausal (Quiala *et al.*, 2012).

El cultivar Mex64-1467, que durante el tratamiento prolongado a 51 °C resultó el de más bajo porcentaje de germinación, mostró también los menores porcentajes de supervivencia.

Debe señalarse que la utilización de 6-BAP en el medio de establecimiento facilitó el incremento del número de brotes a pesar de la aplicación del tratamiento térmico prolongado. El 6-BAP ha sido utilizado con éxito para estimular la proliferación de brotes en diferentes protocolos de cultivo *in vitro* de otros cereales (Martínez-Medina *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2012; Syamala y Devi, 2003).

### **Tercera etapa de saneamiento de diferentes cultivares de caña de azúcar**

El siguiente paso de resiembra de las plantas en el medio de propagación en presencia de 50 mg.L<sup>-1</sup> del antibiótico gentamicina, permitió incrementar el número de brotes, el número de plantas saneadas y consecuentemente, el número de plantas en fase de enraizamiento (tabla 3). La inclusión de este antibiótico de amplio espectro, facilitó la disminución de la contaminación exógena. En estas condiciones de trabajo, este paso conlleva el empleo de antibióticos y el uso de micromeristemas como un tercer tratamiento. La tabla muestra el incremento en el número de plantas en los sucesivos pases, desde P3 hasta P6, que alcanzaron hasta miles de plantas saneadas y enraizadas.

Como ya se ha referido antes, en estos experimentos se partió de material libre de enfermedades, o al menos sin síntomas visuales de las mismas. En estas circunstancias resulta difícil referirse a saneamiento si se

parte de plantas de apariencia sana y vigorosa, pero la idea inicial era garantizar la creación de un banco de germoplasma listo para utilizarse como semilla básica de forma inmediata.

El empleo de ápices meristemáticos ha sido empleado para la micropropagación de la caña de azúcar. Victoria *et al.* (1998) lograron eliminar a la bacteria causante del Raquitismo al utilizar tratamientos combinados de hidrotermoterapia previo al cultivo de meristemas. Similares resultados obtuvieron Peteira *et al.* (1992) quienes alcanzaron entre 96-100% de saneamiento al combinar el cultivo de ápices con termoterapia (50° C durante 10 minutos). El empleo de sistemas combinados ha logrado la eliminación del RSD y también de otros patógenos sistémicos de la caña de azúcar, como la bacteria causante de la escaldadura foliar y el Virus del mosaico de la caña de azúcar (Matsuoka *et al.*, 1988; Sordi y Tokeshi, 1988; Matos, 2002; McGuire *et al.*, 2009).

Con respecto al diagnóstico, aunque el método empleado fue el de tinción de los haces vasculares (STM) descrito por Chagas y Tokeshi (1994), hay que señalar que su carácter presuntivo permite facilitar el análisis y elevar los volúmenes de muestras por su relativa simplicidad, pero puede provocar confusión con otras patologías. El método ha sido previamente empleado como una alternativa inicial a los trabajos de diagnóstico (Iglesia *et al.*, 2007a) y a pesar de la falta de precisión dada por la inespecificidad de los síntomas de esta enfermedad, lo simple del método facilita su realización, ejecución directa en el campo, así como la poca necesidad de equipamiento para el conteo de los haces funcionales y no funcionales. A la vez permite disponer de una escala para interpretar los resultados.

**Tabla 3.** Tratamiento con antibiótico y número de plantas saneadas de los cultivares de caña de azúcar en estudio

| Cultivar   | Tratamiento con gentamicina |             | Plantas saneadas |             | Enraizamiento |
|------------|-----------------------------|-------------|------------------|-------------|---------------|
|            | P3 (brotes)                 | P4 (brotes) | P5 (brotes)      | P6 (brotes) | Plantas       |
| Ragnar     | 52                          | 296         | 440              | 1024        | 1424          |
| CC85-92    | 43                          | 356         | 1014             | 2739        | 4383          |
| RD75-11    | 67                          | 144         | 408              | 992         | 2210          |
| CR74-25O   | 116                         | 438         | 1095             | 2209        | 3264          |
| BJ70-46    | 59                          | 114         | 350              | 800         | 1523          |
| C87-51     | 61                          | 140         | 322              | 966         | 2125          |
| SP70-1143  | 20                          | 88          | 203              | 632         | 1316          |
| Mex64-1487 | 42                          | 108         | 296              | 680         | 1855          |

Una posibilidad que brindan los bancos de germoplasma es conservar y mover material de alta calidad fitosanitaria. La utilización de termoterapia junto a la desinfección del material de trabajo, es una práctica antigua pero muy eficiente para erradicar patógenos que se mueven de forma sistémica a través del vegetal. En el caso de trabajar con meristemos *in vitro*, su pequeño tamaño y su velocidad de propagación disminuyen extraordinariamente la probabilidad de desarrollo de esos patógenos sistémicos, bacterias o virus principalmente. Unido a esto, se conoce de la existencia de sustancias que actúan impidiendo el desarrollo de patógenos, en particular la presencia de guanina, que según estudios realizados, parece tener una acción antimicrobiana (Shuravlev, 1979).

La preservación de los recursos fitogenéticos entendidos éstos como el material hereditario con valor económico, científico o social contenido en las especies, es de importancia capital en la lucha contra diferentes calamidades, como el hambre, la malnutrición mundial, pero también el decaimiento genético de los cultivos y la pérdida de diversidad genética. Es aquí donde juegan un papel importante los bancos de germoplasma y de genes. Los bancos de germoplasma resguardan la fuente de variabilidad requerida por los mejoradores de plantas para el desarrollo de cultivares que permitan al agricultor superar las limitaciones naturales a fin de obtener mayores beneficios de su actividad, así como asegurar la fuente contra la erosión genética (Demey, 2008). Los estudios de la diversidad genética dentro de estos bancos de genes son una de las herramientas que ayudan a tener un control más efectivo sobre la erosión genética. Permiten definir los patrones de variación que determinan la incorporación de individuos a programas de mejoramiento genético, ya sea por sus características promisorias o por susceptibilidad a condiciones bióticas o abióticas, facilitando la incorporación de genes y el establecimiento de la mejor estrategia reproductiva. Esto garantiza la elevada calidad genética.

Un importante aspecto que se debe también señalar como resultado de este trabajo es el mantenimiento de un Banco de germoplasma *in vitro* con las variedades que hay en el banco *in situ* en el campo. Aunque no se muestran detalles en este trabajo, como complemento de esto, el genofondo se conservó a través del mantenimiento del ADN a temperaturas de -20 °C durante tiempos prolongados. Esta creación de los bancos *in vitro* y del "banco de ADN" permite conservar el material genético en espacios muy reducidos, durante largos periodos con independencia de las condiciones ambientales.

Finalmente, se propone una metodología de obtención de material agámico de caña de azúcar, donde se combinan el tratamiento hidrotérmico con el cultivo de yemas mediante la micropropagación de meristemos en diferentes etapas. Esta propuesta de metodo-

logía esta fundamentalmente dirigida a la enfermedad bacteriana sistémica de la caña de azúcar RSD (*Leifsonia xyli* ssp. *xyli* Davis), aunque puede favorecer la disminución de otras enfermedades sistémicas del cultivo como la LSD (*Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson), que se está presentando con frecuencia en un cultivar en crecimiento en el Ecuador como es CC85-92, así como la enfermedad viral Mosaico de la caña de azúcar (VMCA). Con relación al método de confirmación del saneamiento, éste constituye el primer acercamiento, pues debe completarse con el análisis basado en los métodos moleculares (PCR) para ambas enfermedades bacterianas. Estos resultados están en fase de complementación con el método molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el empleo de cebadores específicos de la bacteria *Leifsonia xyli* spp. *xyli* y con el método inmunoquímico ELISA. En la actualidad estos métodos son los más empleados y poseen una alta eficiencia de detección (Iglesia *et al.*, 2007b; Taher-Khani, 2010). Partir de un material vigoroso y al parecer libre de la enfermedad, dificultó la certeza de si efectivamente el saneamiento se llevó a cabo. Sin embargo, la no aparición de los síntomas confirmó la limpieza del material, aun cuando se empleó el método presuntivo de tinción de los vasos no funcionales.

Con relación a la micropropagación, es conocida la condición de rejuvenecimiento fisiológico que introduce y que ha sido descrita desde los primeros trabajos de propagación *in vitro* de meristemos.

Todos estos datos constituyen importante información para lograr un manejo adecuado en la utilización de los recursos fitogenéticos de la caña de azúcar.

Además de lo anterior, este trabajo puede constituir una estrategia para prevenir o disminuir la diseminación de estas enfermedades sistémicas, mediante la entrega a los Cañicultores de semilla de alta calidad fitosanitaria y genéticamente bien identificada, como la obtenida por estos procedimientos. De igual forma, esta semilla puede constituir un material idóneo para el intercambio genético entre países.

## Conclusiones

Se propone una metodología para obtención de semilla de alta calidad genética, que combina los tratamientos hidrotérmicos con las manipulaciones de los meristemos, los cuales favorecen el proceso de saneamiento.

Se estableció un banco de donantes que sirve como material para plantar semilleros de semilla básica, que permita controlar la diseminación de algunas enfermedades sistémicas como el RSD.

## Recomendaciones

Se recomienda completar con métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), con el empleo de cebadores específicos para la bacteria *L. xyli* spp. *xyli*, así como el método inmunoquímico ELISA, que son los más empleados y de mayor eficiencia de detección

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Asistencia Oficial para el Desarrollo de Japón y al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP) por el financiamiento a partir del Proyecto 2KR; también a la Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE), por el apoyo financiero y las facilidades para el desarrollo de este trabajo. Agradecemos igualmente al Ing. Rodolfo Samaniego, al Ing. Carlos A. Ochoa y a Jorge Franco por su ayuda invaluable en diferentes etapas del trabajo. M. Ramos-Leal agradece al acuerdo de colaboración "Biotecnología de la caña de azúcar y empleo de residuos de la agro-industria azucarera", entre el Laboratorio de Biotecnología del Dpto. Microbiología y Virología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, la UNCE y las Facultades de Ciencias Agrarias y Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, que ha permitido realizar parte de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Arellano, A.C., Korneva, S.B., Fischer, F.C., Cabanilla, L., Tola, N., Ochoa, L.A., Ramos-Leal, M. y Pincay, A. (2009). Micropropagación de caña de azúcar en Ecuador. *Revista Biotecnología Vegetal*, 9(4), 235-238
- Arellano, A.C., Ramos-Leal, M., Korneva, S., Pilco, J., Chávez, G., Cabrera, C. y Pincay, A. (2011). Evaluación de la resistencia a la roya parda (*Puccinia melanocephala* Syd.) de somaclones de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) obtenidos en el Ecuador. *Rev. Fitosanidad*, 15(4), 245-250
- Arellano, A.C., Ramos-Leal, M., Loo, Z., Cabanilla, L., Korneva, S.B. y Pincay, A. (2012). Identificación de cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) mediante el empleo de isoenzimas peroxidadas. *Revista CENIC Ciencias biológicas*, 43(3).
- CINCAE. (2011). Informe Anual del Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador. *Manejo de Enfermedades*, 12-17.
- Chagas, P.R.R., Tokeshi, H. (1994). Staining by transpiration method for the diagnosis of ratoon stunting disease in sugarcane. In Rao GP, Gillespie A, Upadhyaya P, Filho B, Agnihotri V, (eds.) *Current Trends in Sugarcane Pathology*, New Delhi, India, 159-162
- China, A. y Pérez, J.R. (1997). Secuencia y manejo de la hidrotermoterapia para el control de enfermedades de la caña de azúcar. *Rev. Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba (ATAC)*, 1, 31-34.
- Costet, L., Le Cunff, L., Royaert, S., Raboin, L.M., Hervouet, C., Toubi, L., Telismart, H., Garsmeur, O., Rousselle, Y., Pauquet, J., Nibouche, S., Glaszmann, J.C., Hoarau, J.Y. and D'Hont, A. (2012). Haplotype structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. *Theoretical and applied genetics*, 125(5), 825-36.
- Demey, J.R. (2008). Diversidad genética en bancos de germoplasma: un enfoque biplot. Disertación de Tesis doctoral. Univ. Salamanca, España, 244 p.
- Graur, D. and Wen-Hsiung, R.I. (2000). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates Inc. USA, 481p.
- Harrison, N.A. and Davis, M.J. (1988). Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Phytopathol*, 78(6), 722-727.
- Hernández, R., Igarza, C.Y., González, Y., Peralta, E.L., Fontanella, R.J., Noa, C.J., Pichardo, T., Alonso, E., García, L. y Rodríguez, M. (1997). Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*. híbrido). *Cuaderno de Fitopatología*, 3, 153-157.
- Iglesia, A., Peralta, E.L., Álvarez, E., Milán, J. y Matos, M. (2007a). Nueva escala de evaluación de la resistencia varietal frente al raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Cuba. *Revista Protección Vegetal*, 22 (1), 34-40
- Iglesia, A., González, R., Martín, D., Díaz, M. y Álvarez, E. (2007b). Aislamiento e identificación morfológica, bioquímica y molecular de *Leifsonia xyli* ssp. *xyli* en Cuba. *Revista Protección Vegetal*, 22 (1), 29-33
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R.J., Dommes, J. and Gaspar, T. (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 181-191
- Korneva, S.B., Maribona, R.H. and Ruiz, A. (1986). *In vitro* cultures of sugarcane Proc. XIX ISSCT Congress, Commission Biotechnology. Jakarta, Indonesia.
- Martín, A. (2002). Los marcadores genéticos en la Mejora Vegetal. En: Genómica y Mejora Vegetal. Nuez, F.; Carrillo, J.M.; Lozano, R. (Eds). Mundi-Prensa. Sevilla, 37-64
- Martínez-Medina, S.J., Gómez-Koski, R., Posada, L., Barbón, R., Acosta, M., Reyes, M., Pérez, M., Torres, D., Pons, M., La O, M., Aguilera, A. y Tejada, M. (2012). Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 101-110.
- Matos, M. (2002). Escaldadura foliar: Evaluación de métodos para el saneamiento y comportamiento de variedades comerciales de caña de azúcar. Tesis de Maestría. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba., 60 pp.
- McGuire, P., Bambach, G., Aiteken, R., Beattie R. and Lokes, S. (2009). RSD control in the NSW industry. *Proceedings of the Australian Society of Sugarcane Technologists*. 31, 195-203.
- Matsuoka, S., Lee, T.S.G. and Masuda, Y. (1988). Proposal for international exchanges of sugarcane clones using meristem tip culture plantlets. *Brazil National Program of sugarcane breeding*, 1-7.
- Medina, R., Faloci, M., Marassi, M.A. and Mroginski, L.A. (2004). Genetic stability in rice micropropagation. *Biocell*, 28 (1), 13-20
- Ministerio de Agricultura, Conservación y Medio Ambiente de España. (2014). Estrategia Española de conservación vegetal 2014-2020. Principios y orientaciones para la conservación de la diversidad vegetal silvestre en España. Edic. Minist. Agricultura, Conservación y Medio Ambiente de España. 77 p.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 443-497
- Pérez, J.R., Montalbán, J., Figueredo, Y., Matos, M., Abrantes, I., Barroso, G. y Delgado, G. (1998). Evaluación del sistema tradicional de producción de semilla empleado en Cuba para el control de enfermedades de la caña de azúcar. Informe Final de Proyecto CITMA. Cod: 00101043. INICA. Cuba. 32 pp
- Pérez-Vicente, L. y Mauri, F. (1986). Efectividad del tratamiento con agua caliente a la semilla de caña de azúcar sobre las infecciones de *Ustilago scitaminea*. *Agrotecnia de Cuba*, 18 (2), 81-82.
- Peteira, B., González, T., Orta, C., Lagomasino, I. y Maribona, R.H. (1992). Saneamiento de RSD por cultivo de meristemo. *Revista Protección Vegetal*, 7 (2-3), 97-101.
- Piñón, D. (2001). Hacia una fitoprotección ecológica de plagas en el SEFIT. En: Curso de actualización en temáticas de sanidad vegetal (SEFIT). Piñón D. (ed.). Edit. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), 1-10. Cuba
- Quiala, E., Cañal, M.J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Villedor, L., de Fera, M. and Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to

- temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(2), 223-234
- Ramallo, J. y Ramallo, N.E.V. (2001). Aplicación de la hidrotermoterapia para la obtención de caña semilla de sanidad controlada. *Avance Agroindustrial (Argentina)*. Junio, 22(2), 16-18.
- Shuravlev, Y.U.H. (1979). Fitoviruses en las plantas y sistemas de modelaje. En *Cultivo de tejidos de plantas*. Edit. Nauka, Moscú, 28-41.
- Sordi, R. and Tokeshi, H. (1988). Cleaning leaf scald-infected sugarcane plants using in vivo thermotherapy plus meristem tip culture. *Brazil National Program of sugarcane breeding*, 1-9.
- Syamalay, D. and Devi, P. (2003). Efficient regeneration of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) from shoot tip explants. *Indian Journal Experimental Botany*, 41 (12), 1482-1486
- Taher-Khani, K. (2010). Bases metodológicas para el desarrollo de un programa de manejo integrado contra la enfermedad raquitismo de los retoños en Irán. *Disertación de Tesis doctoral*. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Cuba. 100 pp.
- Victoria, J.I., Guzmán, M.L, and Jaramillo, A.D. (1998). Disease-free nurseries in sugarcane. Ratoon Stunting Disease Workshop. 7<sup>th</sup> Internat. Cong. Plant Pathol. Edinburgh, Scotland. 1998.

# Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A

## Evaluation of organic acid production by *Streptomyces* spp. and solubilization of three phosphorus sources by strain T3A

Gloria Carolina Prieto-Correal<sup>\*</sup>, Luis Daniel Prada-Salcedo<sup>\*\*</sup>,  
Claudia Liliana Cuervo Patiño<sup>\*\*\*</sup>, Marcela Franco-Correa<sup>\*\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.41667

### Resumen

Quince aislamientos de actinobacterias solubilizadoras de fósforo obtenidas a partir de suelos de los andes orientales colombianos fueron identificadas por sus características morfológicas y por la secuenciación del gen 16S ADN. El análisis BLASTN de las 15 secuencias obtenidas mostró que los aislamientos pertenecían al género *Streptomyces*. Paralelamente, los aislamientos fueron sometidos a la detección de ácidos orgánicos, durante el proceso de solubilización de fósforo con la presencia mayoritaria de los ácidos oxálico, cítrico y glucónico. Dentro de las cepas evaluadas *Streptomyces* sp. T3A fue seleccionada para ser evaluada bajo diferentes fuentes de fósforo inorgánico debido a los resultados de evaluaciones cualitativas y cuantitativas realizadas previamente, en las cuales mostró una actividad solubilizadora de fósforo significativamente alta. Los resultados evidenciaron la capacidad de ésta actinobacteria para solubilizar diferentes fuentes de fosfatos insolubles con valores de 122 mgP·L<sup>-1</sup> para Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 14 mgP·L<sup>-1</sup> para AlPO<sub>4</sub> y 19,6 mgP·L<sup>-1</sup> para roca fosfórica. También los ensayos revelaron que la actividad se mantiene en un rango de pH de 5 a 8 con las mismas fuentes de fosfatos evaluadas. Los resultados presentados contribuyen al avance en la caracterización de estas bacterias como promotoras de crecimiento vegetal con el fin de presentarlos como un recurso clave a nivel de biotecnología agrícola.

**Palabras clave:** *Streptomyces*, Solubilización de fósforo, ácidos orgánicos, actinobacteria, HPLC.

### Abstract

Fifteen isolates of Eastern Cordillera of the Colombian Andes were identified by morphological characteristics and 16S rDNA gene sequence. The BLAST analysis of 15 sequences shows that isolates belong to *Streptomyces*. Also we detected the organic acids in the solubilization process mainly oxalic acid, citric acid and gluconic acid. *Streptomyces* sp. (T3A) was selected in preliminary qualitative and quantitative assays by the high phosphorus solubilizing activity; in this work we evaluate this strain with different forms of inorganic phosphate. The results evidenced the capacity of this actinobacteria to solubilize phosphorous showed 122 mgP·L<sup>-1</sup> Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 14 mgP·L<sup>-1</sup> AlPO<sub>4</sub> and 19,6 mgP·L<sup>-1</sup> for rock phosphate. Also the assays revealed that the activity was maintained between a pH range of 5 to 8 with the same sources of insoluble phosphates evaluated. These results contribute to characterize these strains as plant growth promotion bacteria and as key source in agricultural biotech.

**Key words:** *Streptomyces*, phosphate solubilization, organic acids, actinobacteria, HPLC.

**Recibido:** octubre 10 de 2014

**Aprobado:** abril 28 de 2015

\* Microbióloga Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. g.prieto@javeriana.edu.co

\*\* Microbiólogo Industrial, M.Sc. en Microbiología, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. lprada@javeriana.edu.co

\*\*\* Bióloga, Ph.D. en Ciencias Biológicas, Docente Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. claudia.cuervo@javeriana.edu.co

\*\*\*\* Microbióloga, Ph.D. en Biología Agraria, Docente Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. franco@javeriana.edu.co

† El aporte a este trabajo fue realizado de igual manera.

## Introducción

El fósforo es uno de los tres macronutrientes esenciales, componente clave de moléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, adicionalmente forma parte de la mayoría de los procesos fisiológicos de los organismos; sin embargo, en la nutrición vegetal es un elemento que limita el crecimiento de las plantas debido a que se encuentra en formas poco disponibles para estas (White y Hammond, 2008; Boschetti *et al.*, 2003).

Colombia, al ser un país agrícola requiere técnicas novedosas que eleven en forma considerable la productividad y disminuyan el uso intensivo de fertilizantes químicos que suplen la cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En el caso del fósforo, se reportan deficiencias hasta del 98% de fósforo para las plantas, consecuentemente, una gran porción de los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes son inaccesibles para la planta debido a la rápida formación de complejos insolubles a causa de los diferentes tipos de suelo Andisol, Inceptisol, Mollisol, Oxisol, Ultisol y Vertisol caracterizados por pH bajos y una alta fijación de P (Galvis, 2001; Sierra, 2002; Rao *et al.*, 2004; Vyas *et al.*, 2007; Oberson *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2011; Botiva, 2012). Por tal motivo la práctica común en el país es la adición de abonos o fertilizantes químicos u orgánicos, suplementados con enmiendas fosfóricas, con el objetivo de compensar las deficiencias de este elemento (Burbano y Silva, 2010). La producción tradicional de fertilizantes químicos fosforados incluye tratamientos con efectos negativos al medio ambiente, como consecuencia de la extracción de fosfatos con ácidos a altas temperaturas y, paralelo a esto, con las aplicaciones de los fertilizantes químicos, se observan procesos de eutrofización y erosión (Vassilev y Vassileva, 2003; Son *et al.*, 2006; Hamdali *et al.*, 2008a; 2008b; 2008c).

Colombia tiene el 14% de la biodiversidad mundial y presenta el mayor número de especies/área del planeta, lo que sugiere que esa diversidad en fauna y flora pudiera estar representada también en los suelos colombianos a nivel microbiológico (Ghazanfar *et al.*, 2010). Lo anterior permite proponer el uso de este tipo de organismos como biofertilizantes, tecnología acorde con el medio ambiente para contribuir a solucionar las deficiencias de este elemento en suelos de uso agrícola (Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev *et al.*, 2006; Vyas *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008; Bhattacharyya y Jha, 2012). Por lo cual el presente estudio evaluó la solubilización de fósforo *in vitro* de *Streptomyces* sp. bajo tres fuentes de fósforo insoluble, diferentes condiciones de pH inicial e identificó los ácidos orgánicos involucrados en el proceso de solubilización presentados por estos aislamientos.

## Materiales y métodos

### Identificación de los aislamientos

15 aislamientos de actinobacterias fueron valoradas en este estudio, los aislamientos fueron seleccionados previamente de suelos en los andes orientales colombianos por sus características fenotípicas y la capacidad solubilizadora de fosfatos según lo descrito por Salcedo (2014). Los aislamientos fueron obtenidos a partir de rizosfera de plantas nativas y purificados en medio avena suplementado con nistatina (0.1% v/v), La identificación se basó en sus características morfológicas y en la secuenciación del gen 16S ADNr.

El ADN se obtuvo según el procedimiento descrito por Kumar *et al.* (2010), con algunas modificaciones. La extracción del ADN se realizó a partir de un inóculo de biomasa de cultivo puro homogenizado en 15 ml de TE 1X (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8). 500  $\mu$ l de la biomasa fueron lisados por adición de lizozima (20 mg·ml<sup>-1</sup>) e incubados a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionó SDS al 1% (p/v) y proteinasa K (0.1 mg·ml<sup>-1</sup>) e incubó nuevamente a 55°C por 30 minutos. Luego de la lisis celular el ADN fue extraído por la adición de igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), procedimiento realizado dos veces; posteriormente se realizó un lavado con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (v/v). La precipitación se llevó a cabo con el doble de volumen de etanol puro. Finalmente, la madeja de ADN obtenida se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada grado molecular.

Los fragmentos de ADN del gen 16S ADNr fueron amplificados por PCR a partir de la extracción de ADN acorde al método modificado de Kumar *et al.* (2010). Haciendo uso de los oligonucleótidos fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rP2 (5'-ACGGCTACCTGTACGACTT-3') reportados por Weisburg *et al.* (1991) se realizó la amplificación. La reacción se llevó en volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo aproximadamente 150 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de cada dNTPs, 20 pMol de cada oligonucleótido y 2,6 unidades de la Taq ADN polimerasa "expand high fidelity enzyme" (Roche®). El perfil de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos: a 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos y 72°C por 2 minutos. Finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos.

### Identificación de los ácidos orgánicos por HPLC

La detección de ácidos orgánicos fue realizada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en un Prominence LC20AT Shimadzu® con detector de arreglo de diodos SPD-M20A y horno de columna CTO-20<sup>a</sup>. La separación se realizó en forma isocrática en una co-

lumna Phenomenex de referencia Rezex™ (250 x 4,6 mm, 8 µm ROA-Organic Acid H+ (8%), modo de separación por exclusión iónica) empleando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 N) a una velocidad de flujo de 0,2 mL·min<sup>-1</sup> y temperatura de 30°C. La detección se realizó a una longitud de onda de 210 nm y el volumen de inyección de los patrones y muestras fue de 20 µL. La identificación de los ácidos orgánicos producidos por las actinobacterias, se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de estándares de ácidos orgánicos con los tiempos de retención de los picos del cromatograma de cada muestra, proveniente de filtrados de las fermentaciones cuya biomasa había sido eliminada previamente.

### Microorganismos y cultivo

La actividad solubilizadora de fosfatos fue evaluada en curvas de crecimiento bajo diferentes fuentes de fósforo inorgánico. El aislamiento, tamizaje, identificación morfológica de las actinobacterias y su selección como mejor aislamiento solubilizador de fósforo se realizó según lo reportado por Salcedo (2014). El aislamiento *Streptomyces* sp. T3A presentó una alta eficiencia para solubilizar fosfatos a partir de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y AlPO<sub>4</sub> con valores de 500 µg/ml y 25 µg/ml respectivamente hecho que lo convirtió en un candidato interesante para una caracterización más detallada.

### Evaluación de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes fuentes de fósforo inorgánico

Para evaluar la actividad de solubilización de fósforo de *Streptomyces* sp. T3A con múltiples fuentes de fosfato inorgánicos (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlPO<sub>4</sub> y roca fosfórica), se preparó un inóculo de 10 ml (10% del VET, concentración 1 x 10<sup>7</sup> células·ml<sup>-1</sup>) que fue adicionado a 90 ml de medio NBRIP suplementado con cada fuente de fósforo insoluble y se llevó a incubación a 23°C y 120 rpm, por 7 días. Se tomaron muestras cada 24 horas durante el cultivo, para cada muestra se evaluó la producción de biomasa por peso seco; A partir de la fermentación líquida se tomó el volumen total de cultivo (100 ml). Este volumen de cada medio de cultivo con las diferentes fuentes de fósforo se sometió a centrifugación por 15 minutos a 5.000 rpm. El sobrenadante fue separado y se realizaron tres lavados con solución salina (0.85%), el sobrenadante fue descartando y finalmente se llevaron a un horno a 60°C por tres días, registrando el peso de los tubos cada 24 horas hasta peso seco constante. El consumo de sustrato se determinó por el método de DNS, fósforo soluble liberado por el método de fosfomolibdeno a través del test SPECTROQUANT de Merck® y el pH fue medido con potenciómetro (Miller, 1959; Murphy y Riley, 1962; Ramírez y Cocha, 2003).

### Evaluación de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes condiciones de pH

El inóculo correspondiente a *Streptomyces* sp. T3A fue adicionado a 20 mL de medio NBRIP suplementado con fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y roca fosfórica como fuente de fósforo insoluble, evaluando un pH inicial de 4, 5, 6 y 8 para cada uno de los tratamientos a evaluar. Para cada muestra la cantidad de fósforo soluble liberado fue determinada mediante el método de fosfomolibdeno a través del test SPECTROQUANT de Merck® (Murphy y Riley, 1962).

### Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron realizados con cuatro repeticiones. Los datos fueron analizados por ANOVA y test de Duncan para determinar diferencias significativas entre grupos < 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa SPS 11,0 para software de Windows®.

### Resultados

#### *Identificación molecular de actinobacterias*

El Análisis BLASTN de las 15 secuencias obtenidas mostró que los aislamientos correspondían al género *Streptomyces* sp., la tabla 1 presenta los resultados de identificación molecular y caracterización morfológica de las cepas evaluadas.

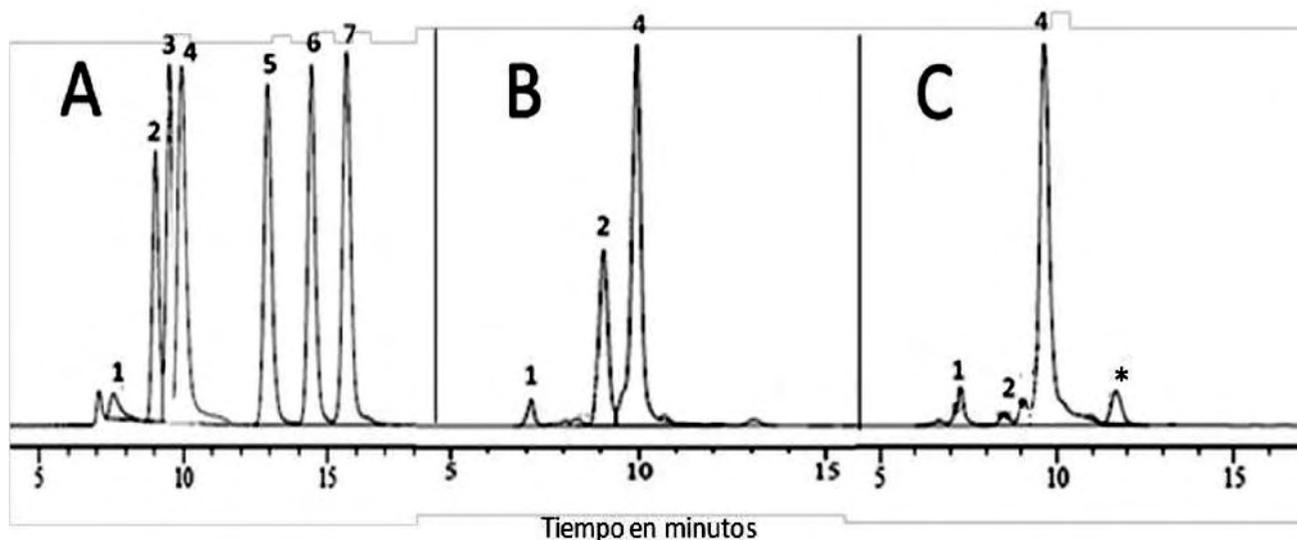
#### *Identificación de los ácidos orgánicos producidos por los aislamientos de Streptomyces spp.*

Las cepas evaluadas fueron sometidas a la detección de ácidos orgánicos por medio de la comparación con estándares comerciales. En la figura 1 se observan los estándares comerciales de ácidos usados y la presencia de ácidos orgánicos en las muestras evaluadas al finalizar el tiempo de fermentación para el caso particular de *Streptomyces* sp. T3A. En algunos casos fue posible evidenciar la presencia de compuestos desconocidos en los extractos, probablemente ácidos que no estaban dentro de los estándares usados (figura 1).

Se identificaron los ácidos oxálico, cítrico y glucónico como los más predominantes, también fue posible observar que la intensidad de las señales eran diferentes en los cromatogramas con las diferentes fuentes de fósforo inorgánico, por lo cual se puede deducir que las concentraciones y el tipo de ácidos orgánicos producidas por las actinobacterias también varían con la fuente de fósforo a la que se expuso el microorganismo, la tabla 2 presenta de manera detallada los resultados de los aislamientos de todas las localidades estudiadas.

**Tabla 1.** Identificación molecular y caracterización morfológica de los aislamientos evaluados.

| Aislamiento | Número acceso GenBank | % Identidad en Blast | Género              | Macroscopía   | Microscopía   |
|-------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---|---|
| T1B         | JX312298.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias blancas puntiformes pulverulentas de color blanco                              | Filamentos de formación tortuosa, con cadenas de conidios                       |
| T1C         | JX312308.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias pequeñas secas, con coloración café  | Micelio no tortuoso, con ramificaciones verticiladas                            |
| T3A         | JX312299.1            | 100                  | <i>Streptomyces</i> | Colonias secas pulverulentas de color verde-grisáceo                                    | Filamentos fragmentados y alta cantidad de conidios                             |
| T3B         | JX312300.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias blancas que se tornan de color gris  | Formaciones en espiral y presencia de conidios redondos                         |
| T3C         | JX312301.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias de coloración oscura verde-grisácea  | Filamentos fragmentados con baja producción de conidios                         |
| T3D         | JX312302.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias blancas con leve color gris  | Filamentos simples y conidios ovalados.   |
| P2R         | JX312312.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias grises, pulverulentas, de color amarillo pálido                                | Micelio aéreo fragmentado, conidios ovalados en cadena.                         |
| P3E         | JX312307.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonia color café oscuro con conidiación de color blanco, reverso café                 | Micelio aéreo, conidios redondos  |
| F1A         | JX312309.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias color crema grisáceo, pigmento difusible anaranjado oscuro                     | Micelio fragmentado, presenta conidios ovalados en cadena corta,                |
| F2A         | JX312304.1            | 100                  | <i>Streptomyces</i> | Colonias gris, color reverso marrón grisáceo  | Micelio con espirales y gran cantidad de conidios                               |
| F2C         | JX312305.1            | 100                  | <i>Streptomyces</i> | Colonias amarillas crema reverso marrón. Pigmento difusible al medio color marrón claro | Micelio levemente tortuoso y conidios organizados en cadenas cortas.            |
| L4C         | JX312317.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonia de color gris claro y reverso negro   | Filamentos largos, fragmentados de micelio tortuoso y con conidios esféricos    |
| V1B         | JX312313.1            | 99                   | <i>Streptomyces</i> | Colonias de color azul verdoso con el tiempo de color plata, reverso crema              | Micelio fragmentado y cadenas largas de conidios con forma esféricas            |
| V1E         | JX312314.1            | 100                  | <i>Streptomyces</i> | Colonias de color rosado con borde blanco, de color crema al reverso                    | Micelio no tortuoso y escaso, con cadenas largas de conidios ovalados.          |
| V2B         | JX312306.1            | 100                  | <i>Streptomyces</i> | Colonias rosadas de borde blanco  | Filamentos largos de micelio sencillo, con cadenas cortas de conidios esféricos |



**Figura 1.** (A) Perfil cromatográfico para los estándares de ácidos orgánicos: 1. Ácido oxálico (7,15 minutos), 2. Ácido cítrico (9,02 minutos) 3. Ácido tartárico (9,49 minutos), 4. Ácido glucónico (9,62 minutos), 5. Ácido succínico (12,94 minutos), 6. Ácido fórmico (14,45 minutos), 7. Ácido acético (15,71 minutos). \* desconocido. (B) Cromatograma de *Streptomyces* sp. (T3A) con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5 g · L<sup>-1</sup> como fuente de fósforo. (C) Cromatograma de *Streptomyces* sp. (T3A) con  $\text{AlPO}_4$  1 g · L<sup>-1</sup> como fuente de fósforo.

**Tabla 2.** Ácidos orgánicos liberados por los aislamientos en los ensayos de fermentación con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{AlPO}_4$ .

| Aislamiento | Ácido producido en fosfato tricálcico | Ácido producido en fosfato de aluminio |
|-------------|---------------------------------------|--|
| T1B         | O, G, CD2                             | G,S                                    |
| T1C         | O, C, G,                              | O, G, S                                |
| T3A         | O, C, G, CD3                          | O, C, G, CD3                           |
| T3B         | O, C, G                               | G, S                                   |
| T3C         | O, C, G, CD3                          | O, C, G, S                             |
| T3D         | G                                     | O, G                                   |
| P2R         | O, C, G                               | O, G                                   |
| P3E         | O, G, CD1, CD3                        | O, G, CD3                              |
| F1A         | O, C, G                               | O, C, G, CD1                           |
| F2A         | O                                     | O, C                                   |
| F2C         | O, C, G, CD1, CD2                     | O, C, G                                |
| L4C         | O, C, G                               | O, G                                   |
| V1B         | O, C, G                               | O, G, CD1                              |
| V1E         | O, C, G                               | O, C, G                                |
| V2B         | O, C, G, CD3                          | O, G, CD3                              |

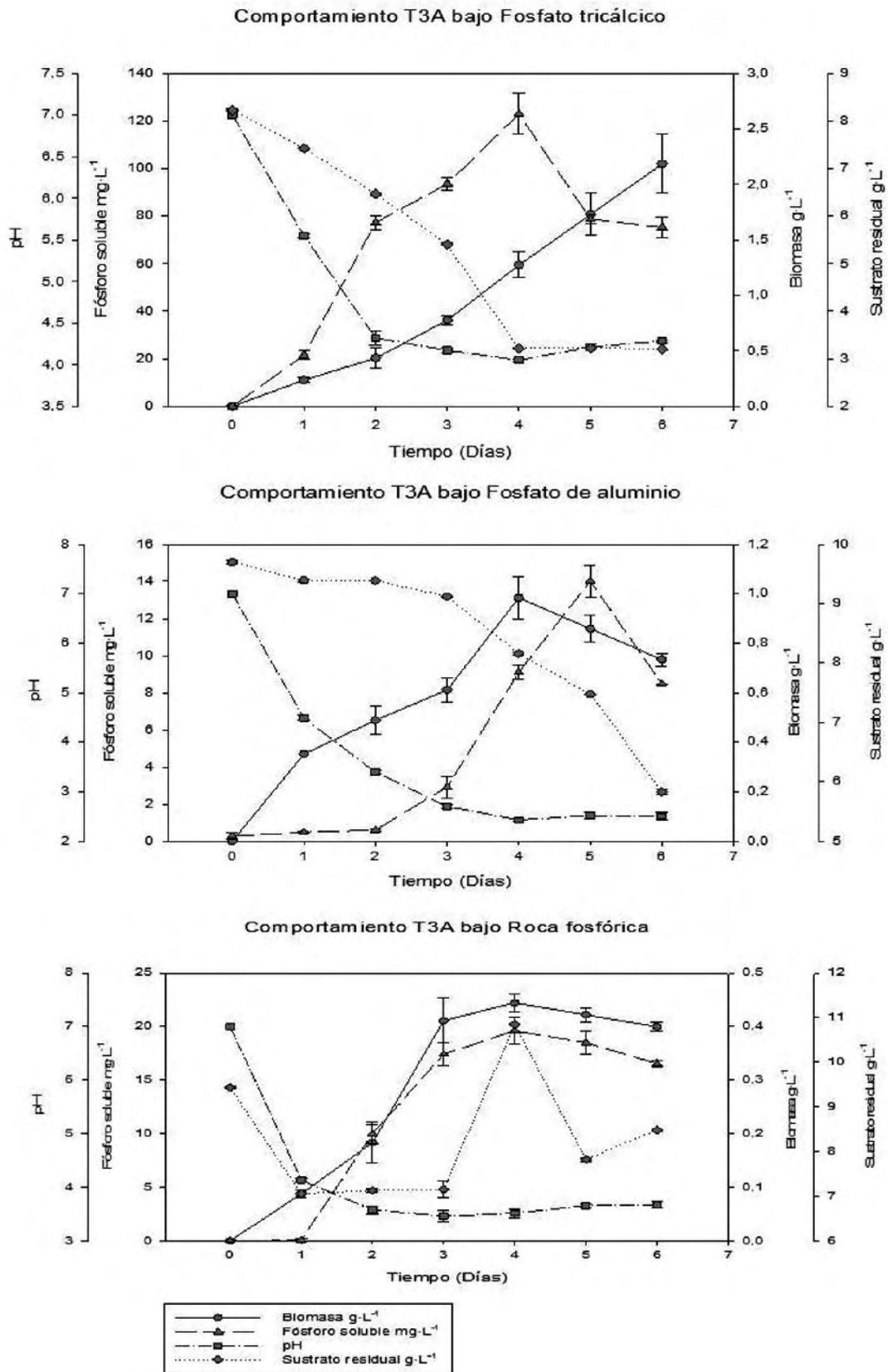
Ácido oxálico (O), ácido cítrico (C), ácido tartárico (T), ácido glucónico (G), ácido succínico (S), ácido fórmico (F), ácido acético (A), compuesto desconocido 1 (CD1), compuesto desconocido 2 (CD2), compuesto desconocido 3 (CD3).

### Comportamiento de *Streptomyces* sp. (T3A) bajo diferentes fuentes de fósforo insoluble

El comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes fuentes de fósforo insoluble ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{AlPO}_4$  y roca fosfórica) es mostrado en la figura 2.

La figura 2 muestra que el fósforo soluble liberado por *Streptomyces* sp. T3A con fosfato tricálcico como fuente de fósforo alcanza un máximo de 122 mgP·L<sup>-1</sup> en el cuarto día de cultivo donde paralelamente se presentó el valor de pH más bajo (4,05). Consecuentemente, el comportamiento de la glucosa presenta una rápida disminución (8,22 a 3,21 g·L<sup>-1</sup>) durante los primeros cuatro días y luego decrece lentamente; a partir del cuarto día se presenta una disminución en la cantidad de fósforo soluble que es liberado (78,7 mgP·L<sup>-1</sup>) y se da un aumento significativo en la producción de biomasa por parte de la actinobacteria (1,2 a 2,2 g·L<sup>-1</sup>).

En el caso de fosfato de aluminio se observa que la cantidad máxima de fósforo soluble liberado (14 mgP·L<sup>-1</sup>) se alcanza al día cinco de incubación con una concentración de biomasa de 0,98 g·L<sup>-1</sup>, siendo un valor inferior si se comparan con la solubilización del fosfato tricálcico, así mismo se observa que el consumo de glucosa por parte del microorganismo fue más lento. Con respecto al pH, se presentaron valores menores descendiendo hasta 2,3 y 2,5; se observa también que existe un periodo de tiempo en el que aunque hay valores bajos de pH, no se liberan formas de fósforo soluble al medio; sin embargo, a medida que se observa un aumento de consumo de glucosa, de forma paralela aumentan las concentraciones de fósforo soluble.



**Figura 2.** Comportamiento de *Streptomyces* sp. (T3A) bajo tres fuentes de fósforo inorgánico (a:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , b:  $\text{AlPO}_4$ , c: roca fosfórica)

Finalmente, los resultados observados durante el ensayo con roca fosfórica muestran que el valor máximo de fósforo soluble fue obtenido el día cuatro de crecimiento alcanzando una concentración de 19,6 mgP·L<sup>-1</sup>, con lo cual se evidencia la capacidad de las actinobacterias para solubilizar este tipo de fuentes minerales de fosfatos.

### Comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes condiciones de pH

La actividad solubilizadora de fósforo para *Streptomyces* sp. T3A fue evaluada bajo diferentes condiciones de pH (4, 5, 6 y 8) para el inicio de la fermentación, con el fin de evaluar la habilidad de las actinobacterias para solubilizar fósforo frente a diferentes rangos de pH, teniendo en cuenta que los microorganismos del suelo están principalmente afectados por diferentes condiciones ambientales, dentro de ellas el pH de los suelos. Los resultados de la solubilización usando fosfato tricálcico como fuente de fósforo se encuentran en la figura 3.

Los resultados revelan que la solubilización de fósforo como se menciona anteriormente está fuertemente ligada a la fuente de fosfatos, sin embargo para el caso de este ensayo fue posible observar como en el medio con pH 4 la liberación de fosfatos solubles se ve negativamente afectada en comparación con los otros pH evaluados, en los cuales continúa presentando una buena actividad solubilizadora de fósforo, siendo esta una característica importante teniendo en cuenta que muchos de los suelos de uso agrícola en el país presentan pH ácido y algunos se encuentran cercanos a 8 (Burbano y Silva, 2010).

En cuanto a los resultados de la solubilización del fósforo usando como fuente de fósforo insoluble roca fosfórica, se observa una disminución en las cantidades de fósforo soluble liberado cuando el microorganismo se encuentra en pH 4 con respecto a los otros pH. Dado que las características de las rocas fosfóricas pueden variar dependiendo su tipo, no es claro en que pH se puede establecer la mejor actividad solubilizadora de fósforo; sin embargo, para el tipo de roca fosfórica usada en este trabajo los resultados obtenidos demuestran la eficiencia del aislamiento *Streptomyces* sp. T3A para actuar sobre enmiendas de uso tradicional como las rocas fosfóricas bajo un amplio rango de pH.

## Discusión

### Identificación molecular de actinobacterias

Basados en un porcentaje de identidad del 99% o mayor, los aislamientos de actinobacterias identificados pertenecen al género *Streptomyces* spp., un género de fácil aislamiento debido a la gran capacidad adaptativa que tiene frente a diferentes fuentes nutricionales, lo cual se relaciona con su alta densidad poblacional en

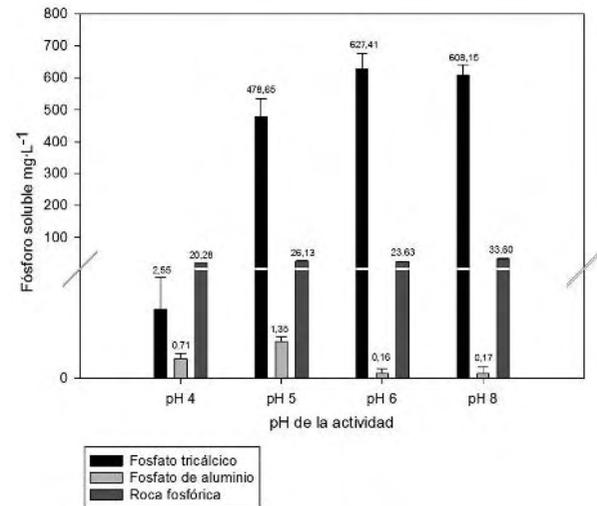


Figura 3. Actividad solubilizadora de fósforo de *Streptomyces* T3A bajo diferentes condiciones de pH

diferentes tipos de suelos representando del 1 al 20% del total de los recuentos de células viables (Schrenpf, 2001). Adicionalmente, el aislamiento en medios orgánicos sencillos, como el medio avena o los denominados ISP (International *Streptomyces* Project), favorecen la presencia de las especies de *Streptomyces* frente a otros géneros de actinobacterias, consecuencia de la secreción de una diversidad de enzimas hidrolíticas. Este hecho no sucede en medios de cultivo con fuentes complejas a nivel estructural (quitina, hidrolizado de pelo y ácido húmico) las cuales estimulan el crecimiento de actinobacterias con tasas de crecimiento más lentas, diferentes a *Streptomyces* (Kurtböke et al., 1992; Seong et al., 2001; Hayakawa, 2008). La importancia de estos aislamientos pertenecientes a este género radica en que debido a la capacidad de reproducirse por conidios, presentar un crecimiento filamentosos y producir una diversidad de enzimas y metabolitos secundarios, les permite tener una adaptación a diferentes condiciones medioambientales y de esta forma, pueden mantener una alta población, adherirse fuertemente a sustratos, descomponer variedad de compuestos y competir por espacio y sustratos, al compararse con otros grupos de microorganismos, estas características los hace buenos candidatos para la producción de biofertilizantes involucrados en los procesos de liberación de formas solubles de fosfatos (Waksman, 1950; Perlman, 1953; Goodfellow y Williams, 1983; Janssen, 2006; Zhang y Xu, 2008).

### Identificación de los ácidos orgánicos producidos por los aislamientos de *Streptomyces* spp.

El hecho de haber detectado la presencia de ácidos orgánicos en las diferentes muestras, sugiere que estos compuestos están involucrados en la liberación de ortofosfatos a partir de fuentes no solubles. La

capacidad de secretar ácidos al medio por parte de los aislamientos puede deberse a que la mayoría de especies del phylum Actinobacteria aunque son de naturaleza aerobia, mantienen la capacidad genética de fermentación, propia de sus antecesores (*Cellulomonas*, *Mycobacterium*, *Corinebacteria*), lo cual apoya su amplia diversidad metabólica (Stackebrandt, 1991; Embley y Stackebrandt, 1994).

En cuanto a los reportes de ácidos orgánicos producidos por este phylum, Chen *et al.* (2006) en suelos subtropicales muestran la presencia de ácido glucónico y un ácido desconocido para diferentes aislamientos de *Rhodococcus erythropolis*, así mismo con cepas del género *Arthrobacter* se publicó la presencia de ácido cítrico y dos ácidos desconocidos. En el trabajo realizado por El-Tarabily *et al.* (2008) se reportan diferentes géneros de actinobacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos como *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinonadura*, *Rhodococcus* y *Streptosporangium*, la solubilización de estas bacterias estaba mediada por ácidos como oxálico, cítrico, málico, glucónico, acético y láctico además de ácidos desconocidos.

Aún cuando los resultados de este trabajo proponen la producción de ácidos como principal mecanismo de liberación de formas disponibles de fosfatos en ensayos *in vitro*, autores como Hamdali *et al.* (2008, 2009, 2012) reportan que la actividad solubilizadora de actinobacterias se debe a la presencia de sideróforos o iones queladores, contrario a los ácidos orgánicos que producen una alcalinización del medio de cultivo. Los resultados del mecanismo de solubilización usado por las actinobacterias de esta investigación pueden variar con respecto a los de Hamdali *et al.* (2008, 2009, 2012), hecho que se ve reflejado en el descenso del pH generado durante los procesos de fermentación (figura 2), además los resultados de este trabajo presentan la producción de ácidos orgánicos como el principal mecanismo de solubilización, debido a que no se evidenció otro tipo de compuesto que pudiese causar el efecto solubilizador al realizar análisis a otras longitudes de onda en los análisis cromatográficos (datos no mostrados). La tabla 1 reporta la presencia de los ácidos succínico, ácido fórmico, ácido acético y los más predominantes ácido oxálico, cítrico y glucónico a partir de las dos fuentes de fosfato evaluadas, estos últimos tres concuerdan con los reportes bibliográficos en donde son los que más contribuyen a la liberación de fósforo (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2009; Walpola y Yoon, 2012).

### Comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo tres diferentes fuentes de fósforo inorgánico.

En este documento se reporta que la actinobacteria *Streptomyces* sp. T3A, aislada de suelos en los andes orientales colombianos, es capaz de solubilizar fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y roca fosfórica como fuente de fósforo insoluble. De acuerdo a los resulta-

dos presentados en la figura 2 para fosfato tricálcico, hay un aumento del fósforo soluble en el medio mientras el pH decrece, lo anterior puede ser explicado porque hay una mayor producción de ácidos orgánicos que contribuyen a liberar el fósforo de la fuente inorgánica no soluble. Adicionalmente, el comportamiento de la glucosa apoya este hecho, sugiriendo que la glucosa en los primeros días de fermentación se orienta a la liberación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo; este proceso se presentó en simultánea con la disminución de la cantidad de fósforo soluble y un aumento en la formación de biomasa que ocurre posiblemente porque el microorganismo al encontrarse en fase exponencial requiere un mayor consumo de nutrientes que pueden ser limitantes (en este caso el fósforo), de acuerdo a lo anterior es posible inferir que los excesos de nutrientes como fosfatos puedan ser acumulados en la biomasa (Franco, 2008; Hamdali *et al.*, 2010; Chaudhry y Nautiyal, 2011).

Las observaciones del comportamiento fisiológico de *Streptomyces* sp. T3A frente al fosfato de aluminio (figura 2) permitieron evidenciar un descenso de pH desde el momento de la inoculación del microorganismo, lo que seguramente se debe a la liberación de iones  $Al^{+3}$ , que acidifican el medio; los resultados también mostraron la relación directamente proporcional en el aumento del consumo de glucosa y la liberación de formas de fósforo solubles, como consecuencia de la producción de los ácidos orgánicos sintetizados por el microorganismo. Finalmente, cabe resaltar que las cantidades bajas de fósforo soluble liberadas, el tiempo en el que son alcanzadas y las tasas de crecimiento de *Streptomyces* sp. T3A con respecto al uso de fosfato tricálcico como fuente de fósforo, sugieren que la solubilización del fosfato de aluminio se da de forma más lenta debido a la estabilidad del complejo y a la toxicidad que puede causar al microorganismo afectando la solubilización; sin embargo, esta condición de ensayo *in vitro* puede generar resultados diferentes en evaluaciones *in vivo*, debido a que el fósforo se encuentra en una matriz diferente, lo que influye en su movilidad generándose otros procesos como inmovilización, adsorción o precipitación (Whitelaw, 2000; Oliveira *et al.*, 2009).

Los resultados presentados para la solubilización de roca fosfórica demostraron la presencia de actinobacterias solubilizadoras de roca fosfórica y son comparables con lo presentado por Hamdali *et al.* (2008) que investigaron la solubilización de diferentes tipos de rocas fosfóricas en aislamientos de *Streptomyces* spp., los cuales liberaban cantidades de fósforo soluble en un rango de 8,34 a 29,67 mgP·L<sup>-1</sup>, contrario a lo encontrado por los autores, en este trabajo, se observó la acidificación del medio producto de la liberación de ácidos orgánicos por el consumo de sustrato, esto confirma que seguramente este es el mecanismo de solubilización que se está llevando a cabo para solubilizar roca fosfórica. Los valores altos de este elemento

pueden estar disponibles en el medio o ser almacenados por *Streptomyces* sp. T3A en forma de polifosfatos, de igual manera el estado fisiológico de la cepa, las condiciones de cultivo y otros minerales presentes en la roca pueden variar los resultados de solubilización. Paralelo a esto se presume que el consumo de glucosa no pudo ser determinado de manera muy precisa debido a silicatos, u otro tipo de compuestos dentro de la composición de la roca fosfórica, los cuales pueden interferir en la medición de azúcares reductores (Dighe *et al.*, 1985; Hamdali *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2010).

### Comportamiento de *Streptomyces* sp. T3A bajo diferentes condiciones de pH

El comportamiento que fue observado por *Streptomyces* sp. T3A bajo pH 4 en comparación a los otros pH evaluados (figura 3) puede deberse posiblemente porque al adicionar ácido para ajustar el pH del medio, este ácido puede estar llevando a cabo el proceso de solubilización, por tal motivo al inocular el microorganismo no hay formas insolubles de fósforo para que desarrolle su actividad, por el contrario es posible que la actinobacteria haga uso de este para su crecimiento. Estos resultados no concordaron con lo encontrado por Park *et al.* (2011), los cuales evaluaron la actividad solubilizadora de fósforo de *Burkholderia cepacia* bajo diferentes condiciones de estrés, dentro de estas el pH, encontrando que este microorganismo es capaz de solubilizar fósforo en un rango de pH de 2 a 11. Este hecho también permitió evidenciar que no solo es necesario un descenso de pH para liberar formas solubles de fósforo sino la presencia de ácidos orgánicos producidos por los microorganismos y que su alcance de solubilización depende del tipo de ácido orgánico, así como del tipo de suelo (Liu *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2011).

Como se observó en la figura 3 la actividad solubilizadora de fosfato de aluminio se favorece en medios con pH bajos (4 y 5), esto se debe probablemente a que los fosfatos de aluminio en soluciones acuosas presentan una solubilidad mínima a pH altos, así que cuando los pH decrecen la solubilidad del fósforo tiende a incrementar, facilitando la disponibilidad del compuesto para que el microorganismo libere las formas disponibles (Whitelaw, 1999; Sayed *et al.*, 2000).

Los resultados de la figura 3 presentan una tendencia similar a la investigación realizada por Vyas *et al.* (2007), los cuales evaluaron la solubilización de roca fosfórica en *Eupenicillium parvum*, demostrando que a medida que el microorganismo se somete a una condición de estrés (en este caso pH bajo), se reduce la actividad solubilizadora de fósforo; caso típico en hongos, microorganismos que metabólicamente tienen un comportamiento metabólico similar a las actinobacterias. Adicional a esto, las diferencias presentadas en los resultados entre estudios pueden atribuirse a las

características, composición y diversas formas de fósforo (solubles e insolubles) que pueden presentarse en las rocas fosfóricas, teniendo en cuenta que al variar el pH, estas pueden reaccionar de forma diferente influyendo en la solubilidad (Salas *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2002).

Se sabe que la adición de biofertilizantes aumenta de manera significativa la toma de fósforo por la planta, motivo por el cual las actinobacterias de este trabajo pueden jugar un papel fundamental en la solubilización del fosfatos presentes en los suelos, evitando la adición de más fósforo que rápidamente se ve absorbido por el suelo (Ahmed *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009). Así mismo es importante señalar que los aislamientos pueden presentar más actividades que promuevan el crecimiento vegetal, lo que finalmente contribuiría a disminuir el uso de otros compuestos químicos que perjudican el medio ambiente.

### Conclusión

Los hallazgos encontrados bajo el presente estudio permiten sugerir a las actinobacterias como microorganismos con el fenotipo solubilizador de fósforo, siendo este el primer reporte de una actinobacteria solubilizadora de fosfato de aluminio. Finalmente se espera que los resultados del presente trabajo conduzcan a la continuidad en la investigación de actinobacterias como PGPR para ser propuestas en el diseño y formulación de biofertilizantes en la industria agrícola.

### Agradecimientos

Proyecto (ID 4566) financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

### Referencias bibliográficas

- Ahmed M.F., Kennedy I.R., Choudhury A., Kecskés M.L. & Deaker R. (2008) Phosphorus Adsorption in Some Australian Soils and Influence of Bacteria on the Desorption of Phosphorus. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 39, 1269-1294.
- Bhattacharyya P. N. & Jha D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 28, 1327-1350.
- Boschetti N. G., Quintero C. E., Benavidez R. A. & Giuffrè L. (2003). Cuantificación de las fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo en suelos de La Mesopotamia Argentina. *Ciencia del suelo*. 21(1), 1-8.
- Botiva M. (2012). Perspectivas agropecuarias primer semestre de 2012. Bogotá D.C. Colombia: Ministerio de agricultura y desarrollo rural. 73 p.
- Burbano H. & Silva F., (2010). Ciencia del suelo: principios básicos. Colombia: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Bogotá, D. C. 396 p.
- Chaudhry V. & Nautiyal C. S. (2011). A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms. *Bioresource Technology*. 102 (17), 8057-8062.
- Chen Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W. A. & Young C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 34, 33-41.

- Dighe A. S., Patel P. M. & Rao K. K. (1985). Effect of phosphate on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 1612-1615.
- El-Tarabily K. A., Nassar A. H. & Sivasithamparam K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*. 39, 161-171.
- Embley T. M. & Stackebrandt E., (1994). The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 48: 257-289.
- Franco-Correa M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis Doctoral. Granada, España: Universidad de Granada. 260 p.
- Galvis L. A. (2001). ¿Qué determina la productividad agrícola departamental en Colombia? Cartagena, Colombia: Banco de la República de Colombia. 37 p.
- Ghazanfar S., Azim A., Ghazanfar M. A., Anjum M. I. & Begum I. (2010). Metagenomics and its application in soil community studies: Biotechnological prospects. *Journal of Animals and Plant Sciences*. 6 (2), 611-622.
- Goodfellow M. & Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review Microbiology*. 37, 189-216.
- Guimarães E. P., Sanz J. I., Rao I. M., Amézquita M. C. & Amézquita E. (1999). Sistemas Agropastoriles en Sabanas Tropicales de América Latina. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 313 p.
- Hamdali H., Bouizgarne B., Hafidi M., Lebrihi A., Virolle M. J. & Ouhdouch Y. (2008a). Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology*. 38, 12-19.
- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M. J. & Ouhdouch Y. (2008b). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24, 2565-2575.
- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M. J. & Ouhdouch Y. (2008c). Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Applied soil ecology*. 40, 510-517.
- Hamdali H., Smirnov A., Esnault C., Ouhdouch Y. & Virolle M. J. (2010). Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of Actinomycetales originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Applied Soil Ecology*. 44, 24-31.
- Hamdali H., Moursalou K., Tchangbedji G., Ouhdouch Y. & Hafidi M. (2012) Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. *African Journal of Biotechnology*. 11, 312-320.
- Hayakawa M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *Actinomycetologica*. 22: 12-19.
- Janssen P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 1719-1728.
- Khan A., Jilani G., Akhtar M., Saqlan S. & Rasheed N. (2009). Phosphorous Solubilizing bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 1 (1), 48-58.
- Kumar A., Bhargava P. & Rai L. C. (2010). Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing Enterobacter and Exiguobacterium species from paddy fields of Eastern Uttar Pradesh, India. *African Journal of Microbiology Research*. 4, 820-829.
- Kürtboke D. I., Chen C. F. & Williams S. T. (1992). Use of polyvalent phage for reduction of *Streptomyces* on soil dilution plates. *Journal Applied Bacteriology*. 72, 103-111.
- León L. A. (1991). La experiencia del Centro Internacional para el desarrollo de fertilizantes en el uso de rocas fosfóricas en América Latina. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 17 (1-4), 49-69.
- Liu H., Wu X. Q., Ren J. H. & Ye J. R. (2011). Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China. *Pedosphere*. 21, 90-97.
- Miller G. L. (1959). Use of Dinitrisalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Murphy J. & Riley J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27, 31-36.
- Oberson A., Pypers P., Bünemann E. & Frossard E. (2011). Management Impact on Biological Phosphorus Cycling in Cropped Soils. Phosphorus in action. Vol 100. Berlin Heidelberg, Germany: Springer. 431-458 p.
- Oliveira C. A., Alves V. M. C. & Marriel I. E. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 1782-1787.
- Paredes-Mendoza M. & Espinosa-Victoria M. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28 (1), 61-70.
- Park J. H., Bolan N., Megharaj M. & Naidu R. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous*. 185, 829-836.
- Perlman D. (1953). Physiological Studies on the Actinomycetes. *Botanical Review*. 19, 46-97.
- Ramírez P. & Coha J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 10 (1), 67-77.
- Rao I. M., Barrios E., Amézquita C. E., Friesen D. K., Thomas R. J., Oberson A. & Singh B. R. (2004). Soil phosphorus dynamics, acquisition and cycling in crop-pasture-fallow systems in low fertility tropical soils: A review from Latin America. Cali, Colombia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 126-134 p.
- Reed S., Townsend A., Taylor P. & Cleveland C. (2011). Phosphorus Cycling in Tropical Forests Growing on Highly Weathered Soils. Phosphorus in Action, Vol. 100. Berlin Heidelberg, Germany: Springer. 339-369 p.
- Rodríguez H. & Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17, 319-339.
- Salas A., Rivero C. & Casanova E. (2006). Fuente de fósforo absorbido y efectividad agronómica en el maíz en un ultisol del estado de Cojeles, Venezuela. *Agronomía tropical*. 56 (1), 43-60.
- Salcedo L.D.P., Prieto C. & Correa MF. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*. 8(8), 734-742.
- Sayed W. F., Mohaowad S. M. & El-Karim M. M. (2000). Effect of Al, Co and Pb ions on growth of *Frankia* spp. in a mineral medium. *Folia Microbiologica*. 45 (2), 153-156.
- Schneider K. D., Van Straaten P., De Orduna R. M., Glasauer S., Trevors J. & Fallow D.;Smith P. S. (2010). Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *Journal Applied Microbiology*. 108, 366-374.
- Schrempf H. (2001). Streptomycetaceae: Life Style, Genome, Metabolism and Habitats. Osnabruck, Germany: John Wiley & Sons, Ltd. 12 p.
- Stackebrandt E. (1991). Aspects on the evolution and phylogeny of the Actinomycetes. *Actinomycetologica*. 5 (2), 56-63.
- Seong C. N., Choi J. H., Baik K. S. (2001). An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil. *The Journal of Microbiology*. 39: 17-23.

- Sierra J. O. (2002). Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 152 p.
- Son H. J., Park G. T., Cha M. S. & Heo M. S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*. 97, 204-210.
- Vassilev N. & Vassileva M. (2003). Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61, 435-440.
- Vassilev N., Vassileva M. & Nikolaeva I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potential and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 137-144.
- Vyas P., Rahi P., Chauhan A. & Gulati A. (2007). Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum*. *Mycological Research*. 111, 931-938.
- Walpole B. C. & Yoon M. H. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*. 6 (37), 6600-6605.
- Waksman S. A. (1950). The actinomycetes: their nature, occurrence, activities, and importance. United States of America: Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 227 p.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. & Lane D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. 173, 697-703.
- Welch S. A., Taunton A. E. & Banfield J. F. (2002). Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal*. 19, 343-367.
- White P. & Hammond J. (2008). The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions: Phosphorus nutrition of terrestrial plants. Springer Netherlands. 51-81 p.
- Whitelaw M. A. (1999). Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. *Advances in Agronomy*. 69, 99-151.
- Xiao C. Q., Chi R. A., Huang X. H., Zhang W. X., Qiu G. Z. & Wang D. Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering*. 33, 187-193.
- Zhang L. & Xu Z. 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*. 8, 379-388.

# Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*)

## Effect of bio-inoculant from microbial consortia phosphate solubilizing natives in development of pastures (*Dichantium aristatum*)

Cecilia Lara Mantilla\*, Jorge Luis Negrete Peñata\*\*

DOI 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50741

### Resumen

El objetivo fue evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos de consorcios formados por bacterias nativas de los géneros *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas luteola* y *Pantoea* sp, con el fin de encontrar el más eficiente. Se realizaron pruebas de antagonismo entre las cepas y se formaron consorcios probando todas las combinaciones posibles en las concentraciones de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  UFC/mL. Se realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativas de la solubilización de fosfatos y teniendo en cuenta éstos resultados, se preparó un bioinoculante el cual fue evaluado en semillas de plantas de pasto angleton (*Dichantium aristatum*) a escala de laboratorio, utilizando un diseño estadístico completamente al azar (DCA) con 3 tratamientos y 5 repeticiones: Tratamiento 1 semillas (control), Tratamiento 2, semillas tratadas con el consorcio de microorganismos seleccionado y Tratamiento 3, semillas tratadas con fertilizantes comerciales DAP y Urea. Se evaluaron las variables número de hojas, área foliar, longitud de la planta, longitud de la raíz y peso seco de todas las plantas. Los resultados de la prueba de antagonismo indicaron que no existe inhibición en el crecimiento de las cepas evaluadas, por lo tanto se formaron consorcios los cuales mostraron mayor eficiencia en la solubilización del fósforo, destacándose el consorcio formado por *Pantoea* sp + *Pseudomonas* sp a una concentración de  $10^8$  UFC/mL y con índices de solubilización de 5,3 y 842 ppm. En las plantas se evidenció un incremento significativo en los parámetros peso seco y área foliar usando el consorcio microbiano, indicando mayor beneficio en comparación con el control.

**Palabras clave:** *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas luteola*, *Pantoea* sp, bioinoculante.

### Abstract

The objective was to evaluate the ability of phosphate solubilizing consortium of native bacteria of the genus *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas luteola* and *Pantoea* sp, in order to find the most efficient. Antagonism tests were conducted between strains and consortia were formed using all possible combinations in the concentrations of  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  CFU / mL. Qualitative and quantitative determinations of the solubilization of phosphates were performed and considering these results, was prepared a bio-inoculant which was evaluated in plant seeds of grass angleton (*Dichantium aristatum*) laboratory scale, using a statistical completely randomized design (CRD) with 3 treatments and 5 repetitions: control Treatment 1 seeds; Treatment 2, seeds treated with the consortium of microorganisms selected and Treatment 3, seeds treated with commercial fertilizers DAP and Urea. The parameters, number of leaves, leaf area, plant length, root length and dry weights of all plants, were evaluated. The test results indicated that there is no antagonism inhibition in the growth of the strains tested thus formed consortia which showed greater efficiency phosphorus solubilization, highlighting the consortium of *Pantoea* sp + *Pseudomonas* sp at a concentration

\* Ph.D. en Química. GRUBIODEQ (Grupo de Investigación en Biotecnología). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Córdoba, Cra 6 N° 74-103, Apartado aéreo 354. Montería, Córdoba-Colombia. Tel (094)7861018 Ext 305. (e-mail: \*lara\_mantilla\_cecilia@hotmail.com; lara.mantilla.cecilia@gmail.com; clara@unicordoba.edu.co

\*\* M.S.c en Biotecnología. GRUBIODEQ (Grupo de Investigación en Biotecnología). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Córdoba, Cra 6 N° 74-103, Apartado aéreo 354. Montería, Córdoba-Colombia. E-mail: Jorkaett@hotmail.com; Jorkaett14@gmail.com

10<sup>8</sup> CFU / mL and 5.3 solubilization rates and 842 ppm. In plants showed a significant increase in dry weight and leaf area parameters, indicating greater benefit with respect to the control treatment.

**Key words:** *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas luteola*, *Pantoea* sp, bio-inoculant.

**Recibido:** marzo 15 de 2014

**Aprobado:** abril 15 de 2015

## Introducción

El fósforo (P) es después del nitrógeno (N) el nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Coyne, 2000). Desempeña un gran papel en la síntesis de proteínas, biosíntesis de lípidos, síntesis de clorofila, compuestos carotenoides y metabolismos de los ácidos orgánicos; interviene en la biogénesis de los glúcidos en la cual aporta energía en forma de ATP o ADP en la reacción de fotosíntesis importante para muchos procesos (Navarro y Navarro, 2003). Sin embargo, el fósforo soluble es un nutriente limitado para producción de biomasa en un ecosistema natural (Ha-meeda et al., 2006).

La deficiencia del fósforo en el suelo influye en el tiempo de la cosecha y madurez del desarrollo de la planta, disminuyendo el rendimiento de los cultivos; hecho que conlleva a la implementación de fertilizantes químicos fosforados, fósforo que se acumula en formas no solubles ni asimilables, debido a que, al adicionarlo al suelo el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, hierro o aluminio que provoca su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Fernández et al., 2005).

Algunas especies microbianas del suelo tienen la capacidad de convertir las formas insolubles del fósforo en formas asimilables para las plantas; la acción de solubilización puede generarse a través de procesos como producción de ácidos orgánicos, quelación e intercambio de reacciones (Begonia et al., 2004). Los biofertilizantes son insumos biológicos basados en microorganismos que viven en el suelo o en la planta y que cumplen funciones directas o indirectas en la nutrición de ésta, bien sea, supliendo, captando o haciendo disponible elementos esenciales para los cultivos, así como, suministrándole sustancia promotoras de crecimiento vegetal e inductoras de resistencia sistémica ante condiciones de estrés biótico o abiótico (López, 2010). Los biofertilizantes o inoculantes microbianos se constituyen en un componente vital para los agroecosistemas, al movilizar o hacer más asimilable, elementos esenciales como el caso del fósforo. Dentro de los microorganismos que han demostrado tener eficiencia en la solubilización de fosfatos se encuentran varios géneros destacándose *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Aeromonas drophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter sakasaki*, *Pantoea* sp y *Enterobacter cloacae* (Lara et al., 2011).

Los biofertilizantes basados en microorganismos rizoféricos son una alternativa emergente a los fertilizantes químicos inorgánicos para incrementar la fertilidad y producción de cultivo en agroecosistemas sustentables, debido a que son productos basados en microorganismos con funciones importantes en la nutrición vegetal, ha mostrado efecto benéfico para los cultivos reduciendo el uso indiscriminado de sustancias químicas y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos (Echeverri y Castilla, 2008; Wu et al., 2005). Por lo anteriormente mencionado, es de gran interés el estudio de los microorganismos solubilizadores de fosfato y los posibles consorcios que se pueden dar entre ellos para aumentar la disponibilidad del elemento, de esta forma se reducen los costos en el sector agrícola unas de las principales bases de la economía del departamento de Córdoba al igual que otros departamentos de Colombia.

La región de Córdoba además de ser agrícola es considerada una importante zona ganadera que sustenta la alimentación de los animales principalmente en las especies forrajeras existentes como la gramínea *Dichantium aristatum* (pastos Angleton). Esta planta es muy apetecible por el ganado y es utilizado en la fabricación de heno, para suplir las necesidades alimenticias de los animales en procesos de producción de carne o leche, a un costo mucho menor que los concentrados (Cuadrado et al, 2003). Sin embargo las áreas de cultivo del pasto Angleton han sido sometidas al uso excesivo de fertilizantes químicos lo cual ha influido en la desestabilización ecológica del suelo afectando negativamente la actividad microbiana comprometida en la nutrición vegetal; como consecuencias se ha limitado los nutrientes disponibles para las plantas (dentro de ellos el fósforo) siendo necesario la búsqueda de alternativas que puedan mejorar este panorama.

Conociendo la importancia del fósforo para el óptimo desarrollo de las plantas y teniendo en cuenta la problemática que conlleva una baja disponibilidad de P en el cultivo de pastos Angleton, se evaluó la capacidad solubilizadora de fosfato de consorcios formados por bacterias nativas de los géneros *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas luteola* y *Pantoea* sp, con el fin de buscar el más eficiente, para ser empleados en la producción de biofertilizantes aplicados a plantas de pastos Angleton.

## Materiales y métodos

### Pruebas de antagonismo

Se utilizaron las cepas nativas *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas luteola* y *Pantoea* sp. aisladas de suelos rizosféricos de zonas cultivables del departamento de Córdoba - Colombia, que demostraron ser eficientes en su capacidad de solubilizar fosfato y que pertenecen al Banco de cepas del laboratorio de Biotecnología GRUBIODEQ (Universidad de Córdoba) (Lara et al., 2011). Las cepas fueron sometidas a pruebas de antagonismo con el fin de verificar que no existiera inhibición entre ellas y así poder formar los consorcios; las pruebas de antagonismo se realizaron en el agar Mueller Hinton, mediante la técnica de difusión en agar (Beltrán et al., 2005). El criterio de eliminación de cepas se determinó por la presencia de halos de inhibición de crecimiento con diámetros mayores a 5 mm entre la cepa sembrada masivamente y la cepa enfrentada (Barragán et al., 2003).

### Pruebas cualitativas y cuantitativas

Para la realización de las pruebas cualitativas y cuantitativas se fabricaron biopreparados de cada cepa, empleando Erlenmeyers de 100 mL que contenían 45 mL de medio de cultivo estéril y teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento microbiano: temperatura ambiente ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ), tiempo de incubación de 12 -18 horas y agitación constante de 150 rpm. Se produjeron biopreparados de concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/mL, las cuales fueron cuantificadas a través de diluciones seriadas por la técnica de microgota (Moreno et al., 2000). Posteriormente se procedió a realizar la evaluación cualitativa y cuantitativa de la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas nativas individual, como en consorcio, a concentraciones  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/mL; los consorcios se formaron con las cepas aisladas que no presentaron ningún efecto antagonista a concentraciones iguales.

### Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfato

A los biopreparados elaborados con cepas puras por individual y en consorcios, se les determinó en medio NBRIP (Nautiyal, 1999), la capacidad cualitativa de solubilización de fosfatos que presentaban los microorganismos a concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/mL. Las cajas de NBRIP luego de ser inoculadas por la técnica de pozos, con cada una de las cepas puras y con el consorcio bacteriano, se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 14 días hasta la aparición de halos claros alrededor de las UFC solubilizadoras de fosfato. El tamaño de los halos se calculó según el índice de solubilización:  $IS=A/B$  (A: diámetro de la colonia + diámetro del halo y B: diámetro de la colonia) (Kumar y Narula, 1999) las mediciones se realizaron a los 7 y 14 días respectivamente después de la inoculación con el fin de evaluar

el comportamiento de las cepas a través del tiempo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfato

La capacidad cuantitativa de solubilización de fosfato se determinó en medio NBRIP (Líquido), se utilizó el método colorimétrico ácido vanadomolibdofosforico (Kitson y Mellon, 1944) basado en una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo, la intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfatos. Por éste método se evalúan bacterias que poseen capacidad de solubilizar componentes fosfatos inorgánicos insolubles, como el fosfato tricalcico, fosfato dicalcico y hidroxiapatitas. Para esta prueba se tomó 1 mL de biopreparado y se adiciono a 9 mL de medio NBRIP estéril, se incubó por 72 h a temperatura ambiente ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ), en agitación constante a 150 rpm; transcurrido este tiempo, se tomó el sobrenadante, se aplicó el reactivo (vanadomolibdato) y se leyó la absorbancia a la longitud de onda de 440nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 20 Vis (Thermo Fisher Scientific Inc.) y empleando la curva de calibrado  $y = 0,0059x + 0,0037$ ,  $R^2 = 0,9912$ , estandarizada por el equipo de investigación del Laboratorio GRUBIO-DEQ. Se determinaron las concentraciones en ppm. Como blanco se tomó únicamente el medio NBRIP y se realizó todo el proceso. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Evaluación del efecto de los bioinoculantes en plantas de pasto Angleton (*Dichantium aristatum*)

Una vez seleccionados los microorganismos o consorcios eficientes, se sembraron por la técnica de estría masiva en agar nutritivo y se incubaron durante 24 h a  $36^\circ\text{C}$ . Los bioinoculantes se produjeron en Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de caldo nutritivo estéril, cada Erlenmeyer se inoculó con los microorganismo eficientes y se incubo a temperatura ambiente ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ), manteniendo una agitación constante de 150 rpm en un shaker por un período de 24 h; con el fin confirmar la concentración celular en cada bioinoculante se evaluó el crecimiento por el método de diluciones seriadas, al final del proceso; todos los ensayos se realizaron por triplicado (Seeley et al., 1973). De esta forma se ajustaron los inoculantes a la concentración que presentaron mayor rendimiento en la solubilización de fosfato.

Para realizar el experimento se utilizó semillas de pasto Angleton (*Dichantium aristatum*) desinfectadas con etanol al 70% durante 5 min. y luego con solución de hipoclorito de sodio 3% durante 5 min.; las semillas fueron inmersas en los bioinoculantes durante 60 min. y fueron evaluadas bajo condiciones controladas de vi-

vero, para esto se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos y cinco repeticiones, que consistieron en:

**Tratamiento 1 (control):** Semillas sin ningún tipo de tratamiento.

**Tratamiento 2:** Semillas tratadas con el bioinoculante en la concentración más eficaz y sin fertilización química.

**Tratamiento 3:** Semillas tratadas con fertilizantes químicos comerciales Fosfato diamónico (DAP) y Urea.

El suelo utilizado presentó las siguientes características: MO= 1.38%; P= 7,5 ppm, DA= 1.5 g/cm<sup>3</sup> y K= 0.88 meq/ 100g) y la fertilización química se realizó de acuerdo al análisis de suelo y los requerimientos nutricionales para el pasto angleton (N: 230; P: 53; K: 252 ha/año). De acuerdo a lo anterior al tratamiento con fertilizante químico se le aplicó 0,9 g/recp de urea y 0,0144g/recp de DAP a los 8 días después de la siembra (DDS). El experimento se desarrolló en macetas de 0.045 m<sup>2</sup> de área.

Se utilizaron 2 g de semillas para cada maceta, las cuales fueron sembradas al voleo a 1 cm de profundidad y esparcidas aleatoriamente por toda la superficie de la maceta. El ensayo se desarrolló en predios de la Universidad de Córdoba, (3 Km. vía Montería-Cereté), en un vivero del departamento de Ingeniería Agronómica, con una temperatura promedio de 29 °C, presión atmosférica de 756.96 mm y humedad relativa de 79 %; el suelo utilizado fue de textura arcillosa tomado de zonas sin cultivar de previos de la Universidad de Córdoba (Degiovanni et al., 2004). No se utilizó ningún tipo de plaguicida. Se realizaron mediciones a los 21 y 35 días después de la germinación, en cada muestreo se recogieron 3 plantas al azar de cada repetición, las variables a tener en cuenta fueron los siguientes parámetros biométricos (Hernandez, 2002 y Ramirez y Perez, 2006): a) número de hojas (No.): conteo de las hojas cotiledonales y verdaderas fotosintéticamente activas en las diferentes plantas; b) área foliar (cm<sup>2</sup>): se midió tomando como referencia las cuadrículas de hojas de papel milimetrado en cada una de las hojas cotiledonales de las plantas muestreadas; c) longitud de la planta (cm): se tomó en cuenta la medida desde la raíz hasta la hoja más larga de cada una de las plantas muestreadas; d) longitud de la raíz (cm): medición de la raíz principal de cada planta muestreada; e) peso seco (g): se llevaron a secado en estufa a 60 °C hasta alcanzar peso seco constante, una vez secas se determinó su peso. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Análisis estadístico

Se realizó la evaluación de los datos obtenidos de los parámetros biométricos de las plantas de pasto Angleton

en el paquete estadístico SAS 9.2 (SAS, 2010), se empleó un diseño completamente al azar y las medias se compararon mediante contrastes ortogonales en el mismo software; se consideró P<0.05 y P<0.01 como diferencias significativa y altamente significativa, respectivamente. También se aplicó la prueba de Tukey.

## Resultados y discusión

### Prueba de Antagonismo

Al realizar la lectura no se evidenció antagonismo por parte de ninguna de las cepas, ya que se desarrollaron sin inhibir el crecimiento entre ellas. Lo anterior indica que no existe ningún tipo de antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (Lisis enzimática) que impidan el libre desarrollo de los microorganismos.

### Evaluación cualitativa de la capacidad solubilizadora de fosfato

Las mediciones de la capacidad cualitativa de solubilización de fosfato realizada a los 7 y 14 días de forma individual y en consorcios, se muestran en la tabla 1 y tabla 2.

A los 7 días del ensayo se observaron que los valores promedios de los índices de solubilización oscilaron entre 2,3 a 4,8 mm (tabla 1). En esta etapa se destacaron los consorcio *Burkholderia cepacia* + *Pantoea* sp + *Pseudomonas* sp a la concentración 10<sup>8</sup> UFC/mL, *Pseudomonas luteola* + *Pseudomonas* sp a la concentración 10<sup>7</sup> UFC/mL y *Burkholderia cepacia* + *Pantoea* sp a la concentración 10<sup>6</sup> UFC/mL; lo anterior demuestra que la formación de consorcio representa una mayor solubilización que de forma individual, superando a lo encontrado por Lara et al. (2011a) con IS de 4,0 mm y similares a los encontrados por Bobadilla y Rincón (2008) con IS entre 3,3 – 5 mm.

En la tabla 2 se resumen los valores promedio de los índices de solubilización de las cepas individual y en consorcio a los 14 días de ensayo; los valores oscilaron entre 5,6 a 2,1 mm.

A los 14 días se observó una tendencia similar de las cepas individuales y en combinación, al obtenido durante los 7 días; se destacaron nuevamente los consorcios y, entre ellos, *Pantoea* sp + *Pseudomonas luteola*, *Pantoea* sp + *Pseudomonas* sp y *Pantoea* sp + *Pseudomonas luteola* + *Pseudomonas* sp; este último presentó los valores más altos en los índices de solubilización con 5,6 mm, resultados que superan a los encontrados por Guzmán (2012) en donde el mayor índice de solubilización a los 14 días fue de 5,05.

Los resultados de la prueba demostraron que los índices de solubilización de fosfato de algunos consorcios fue mayor en comparación con los IS de las cepas individuales, demostrándose un efecto sinérgico favorable.

**Tabla 1.** Promedio de índices de solubilización a los 7 días.

| Promedios de índices de solubilización (IS) |                                      |                       |                                      |                        |                                      |                        |
|---|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Día 7                                       |                                      |                       |                                      |                        |                                      |                        |
| Combinaciones                               | Concentración 10 <sup>8</sup> UFC/mL |                       | Concentración 10 <sup>7</sup> UFC/mL |                        | Concentración 10 <sup>6</sup> UFC/MI |                        |
|   | DT(mm)                               | IS(mm)                | DT(mm)                               | IS(mm)                 | DT(mm)                               | IS(mm)                 |
| 1+2   | 17±0,1                               | 2,9±0,1 <sup>FE</sup> | 16±0,1                               | 3,7±0,1 <sup>DCE</sup> | 15±0,1                               | 4,8±0,1 <sup>A</sup>   |
| 1+3   | 18±0,3                               | 2,5±0,3 <sup>G</sup>  | 14±0,2                               | 3,0±0,3 <sup>DFE</sup> | 21±0,2                               | 3,1±0,2 <sup>DCE</sup> |
| 1+4   | 18±0,2                               | 3,0±0,2 <sup>FE</sup> | 14±0,1                               | 2,6±0,1 <sup>GF</sup>  | 22±0,3                               | 3,0±0,3 <sup>DE</sup>  |
| 2+3   | 8,0±0,1                              | 3,7±0,1 <sup>DC</sup> | 17±0,4                               | 4,4±0,4 <sup>AB</sup>  | 20±0,2                               | 2,8±0,3 <sup>DE</sup>  |
| 2+4   | 20±0,1                               | 4,3±0,1 <sup>AB</sup> | 20±0,2                               | 3,9±0,2 <sup>BC</sup>  | 19±0,3                               | 3,7±0,3 <sup>BC</sup>  |
| 3+4   | 10±0,2                               | 2,7±0,3 <sup>FG</sup> | 19±0,3                               | 4,8±0,4 <sup>A</sup>   | 16±0,1                               | 3,3±0,1 <sup>DC</sup>  |
| 1+2+3                                       | 19±0,2                               | 4,2±0,2 <sup>BC</sup> | 17±0,2                               | 3,8±0,2 <sup>DC</sup>  | 16±0,2                               | 3,0±0,2 <sup>DCE</sup> |
| 1+2+4                                       | 19±0,1                               | 4,8±0,1 <sup>A</sup>  | 18±0,2                               | 4,0±0,2 <sup>BC</sup>  | 15±0,3                               | 2,9±0,3 <sup>DE</sup>  |
| 2+3+4                                       | 18±0,3                               | 4,6±0,4 <sup>A</sup>  | 17±0,2                               | 4,4±0,2 <sup>AB</sup>  | 17±0,2                               | 4,4±0,2 <sup>BA</sup>  |
| 3+4+1                                       | 16±0,1                               | 2,8±0,1 <sup>FG</sup> | 9,0±0,1                              | 2,3±0,1 <sup>G</sup>   | 13±0,2                               | 2,4±0,3 <sup>E</sup>   |
| 1   | 19±0,3                               | 3,4±0,3 <sup>FE</sup> | 8,0±0,3                              | 2,3±0,3 <sup>G</sup>   | 17±0,3                               | 2,7±0,3 <sup>E</sup>   |
| 2   | 18±0,1                               | 4,6±0,1 <sup>AB</sup> | 9,0±0,2                              | 2,8±0,2 <sup>GF</sup>  | 20±0,2                               | 3,0±0,3 <sup>DCE</sup> |
| 3   | 8,0±0,1                              | 2,6±0,1 <sup>FG</sup> | 7,0±0,1                              | 2,4±0,2 <sup>GF</sup>  | 21±0,2                               | 3,1±0,3 <sup>DCE</sup> |
| 4   | 12±0,1                               | 3,4±0,1 <sup>DE</sup> | 10±0,2                               | 3,0±0,2 <sup>GFE</sup> | 17±0,2                               | 2,9±0,2 <sup>DCE</sup> |

1. *Burkholderia cepacia*, 2. *Pantoea* sp, 3. *Pseudomonas luteola*, 4. *Pseudomonas* sp, Índices de solubilización (IS), Diámetros totales promedios de las colonias (DT), a. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado. Los valores seguidos con letras superíndices distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según tukey.

### Evaluación cuantitativa de la capacidad solubilizadora de fosfato

Los datos obtenidos de la evaluación cuantitativa de la capacidad solubilizadora de fosfato de las cepas nativas, utilizando el método colorimétrico vanadomolibdofosforico se resumen en la tabla 3; se observan valores entre 117 y 842 ppm.

Los microorganismos en consorcios presentaron mayor solubilización de fosfato que aquellos que se encontraban por individual debido a que los consorcios microbianos en muchos casos interactúan de manera sinérgica estimulando algunas actividades físicas o bioquímicas de las bacterias involucradas en las mezclas; la concentración a la cual presentaron mayor eficiencia fue a 10<sup>8</sup> UFC/ml, destacándose el consorcio conformado por *Pantoea* sp + *Pseudomonas* sp, además este mismo mostró buenos resultados en las concentraciones de 10<sup>7</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/ml; también en esta etapa se destacó el consorcio formado por *Burkholderia cepacia*, + *Pantoea* sp a la concentración de 10<sup>7</sup> UFC/ml.

Los anteriores resultados superan a los encontrados por Cordero *et al.*, (2008) en la evaluación de una cepa de *Pantoea* sp. (9C) la cual presentó solubilización de aproximadamente 400 µg P mL<sup>-1</sup> entre las 40 - 60 horas. Igualmente superaron a estudios realizados por Osorio y Lara (2013) que evaluaron consorcios formados por *Pantoea* sp y *Azotobacter* sp obteniendo resultados 602.60 ppm a la concentración de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Los resultados de la evaluación cuantitativa confirmaron que el consorcio formado por *Pantoea* sp + *Pseudomonas* sp a la concentración 10<sup>8</sup> UFC/mL fue el mejor corroborando los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa. Por lo anterior el consorcio fue escogido para el ensayo siguiente.

### Ensayos en semillas de pastos angleton (*Dichanthium aristatum*)

La tabla 4 muestra los resultados promedios de los parámetros biométricos medidos, correspondientes a, cantidad de hojas, longitud de la planta, área foliar,

**Tabla 2.** Valores promedio de índices de solubilización a los 14 días.

| Promedios de índices de solubilización (IS) |                                      |                        |                                      |                       |                                      |                         |
|---|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Combinaciones                               | Día 14                               |                        |                                      |                       |                                      |                         |
|   | Concentración 10 <sup>8</sup> UFC/mL |                        | Concentración 10 <sup>7</sup> UFC/mL |                       | Concentración 10 <sup>6</sup> UFC/MI |                         |
|   | DT(mm)                               | IS(mm)                 | DT(mm)                               |                       | DT(mm)                               | IS(mm)                  |
| 1+2   | 21±0,3                               | 3,1±0,2 <sup>DE</sup>  | 23±0,3                               | 4,3±0,3 <sup>B</sup>  | 25±0,3                               | 5,2±0,3 <sup>A</sup>    |
| 1+3   | 28±0,3                               | 2,9±0,3 <sup>FE</sup>  | 25±0,2                               | 3,3±0,3 <sup>ED</sup> | 31±0,2                               | 3,4±0,2 <sup>DFCE</sup> |
| 1+4   | 27±0,2                               | 3,7±0,1 <sup>CD</sup>  | 24±0,2                               | 3,2±0,1 <sup>ED</sup> | 30±0,2                               | 3,1±0,2 <sup>FE</sup>   |
| 2+3   | 18±0,3                               | 5,5±0,3 <sup>A</sup>   | 23±0,2                               | 4,8±0,2 <sup>B</sup>  | 28±0,3                               | 3,3±0,3 <sup>DFE</sup>  |
| 2+4   | 30±0,3                               | 5,3±0,3 <sup>A</sup>   | 28±0,2                               | 4,5±0,3 <sup>B</sup>  | 25±0,2                               | 4,6±0,2 <sup>AB</sup>   |
| 3+4   | 22±0,3                               | 3,0±0,2 <sup>FDE</sup> | 25±0,3                               | 4,1±0,3 <sup>CB</sup> | 27±0,2                               | 4,0±0,3 <sup>BC</sup>   |
| 1+2+3                                       | 26±0,2                               | 4,3±0,2 <sup>B</sup>   | 24±0,2                               | 3,7±0,2 <sup>CD</sup> | 27±0,2                               | 3,7±0,1 <sup>DC</sup>   |
| 1+2+4                                       | 25±0,2                               | 5,2±0,2 <sup>A</sup>   | 25±0,2                               | 4,1±0,2 <sup>CB</sup> | 28±0,3                               | 3,2±0,3 <sup>DFE</sup>  |
| 2+3+4                                       | 24±0,4                               | 4,4±0,3 <sup>B</sup>   | 23±0,4                               | 5,6±0,4 <sup>A</sup>  | 28±0,2                               | 3,8±0,2 <sup>DC</sup>   |
| 3+4+1                                       | 28±0,2                               | 3,5±0,3 <sup>CDE</sup> | 14±0,2                               | 2,2±0,2 <sup>GF</sup> | 28±0,2                               | 3,2±0,2 <sup>DFE</sup>  |
| 1   | 27±0,2                               | 4,0±0,2 <sup>CB</sup>  | 11±0,2                               | 2,1±0,3 <sup>G</sup>  | 30±0,2                               | 3,7±0,2 <sup>DCE</sup>  |
| 2   | 25±0,3                               | 5,2±0,3 <sup>A</sup>   | 14±0,2                               | 3,0±0,2 <sup>ED</sup> | 30±0,2                               | 3,3±0,3 <sup>DFCE</sup> |
| 3   | 10±0,3                               | 2,7±0,3 <sup>F</sup>   | 11±0,4                               | 2,8±0,3 <sup>EF</sup> | 28±0,3                               | 3,3±0,4 <sup>DFE</sup>  |
| 4   | 21±0,2                               | 4,0±0,2 <sup>CB</sup>  | 17±0,3                               | 3,1±0,3 <sup>ED</sup> | 30±0,2                               | 2,9±0,3 <sup>F</sup>    |

1. *Burkholderia cepacia*, 2. *Pantoea* sp, 3. *Pseudomonas luteola*, 4. *Pseudomonas* sp, Índices de solubilización (IS), Diámetros totales promedios de las colonias (DT), a. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado. Los valores seguidos con letras superíndices distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según tukey.

longitud de raíz principal y peso seco para los diferentes tratamientos:

**Longitud de la planta (cm).** Estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, durante los días 21 y 35; sin embargo se evidenció mayor longitud para T3 y T2 (45y 38 cm respectivamente) en comparación con T1. El tratamiento T2 ( consorcio) mostró un valor más alto que el testigo (T1) lo cual puede ser debido a la disponibilidad del fósforo proporcionado por el consorcio teniendo en cuenta que éste nutriente es esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Coyne, 2000); también es posible que las cepas puedan producir fitohormonas de crecimiento vegetal favoreciendo el crecimiento de la planta puesto que dentro de los géneros bacterianos que han sido reportados como productores de AIA, se encuentra *Pseudomonas* sp. (Ahmad et al., 2006). Los datos obtenidos están en concordancia con las investigaciones realizadas por Rajkumar et al. (2006) quienes reportan incremento en la longitud de las plantas de mostaza inoculadas con *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp en comparación con las plantas no inoculadas; simi-

lares resultados se obtuvieron en el trabajo de Galvis y Lara (2013) utilizando plantas de pasto Angleton.

**Cantidad de hojas (No.).** Para esta variable biométrica a los 21 días, se observaron los mejores resultados promedios para el T3 mostrando diferencias significativas ( $P<0,05$ ); estos datos pueden atribuirse a una mayor disponibilidad de nutrientes proporcionada por la fertilización química. A los 35 días no se presentó diferencias significativas entre los resultados promedios de los tratamientos lo que concuerda con estudios realizados por Pastor y Lara (2013) quienes, para la variable número de hojas en pasto Angleton no encontraron diferencias significativas en ninguna de las mediciones realizadas.

**Área Foliar (cm<sup>2</sup>).** Se evidenció mayor área foliar en los tratamientos T3 y T2 en comparación con el tratamiento T1, obteniéndose una diferencia altamente significativa ( $P<0,01$ ) a los 35 días; ésta característica incide en una mejor capacidad fotosintética de las plantas, que redundará en un mayor crecimiento y mayor desarrollo de su parte aérea (Mayak et al., 2004; Santillana, 2006). Investigaciones realizadas por Ahmad et al. (2013) han encontrado correlación entre el incremen-

**Tabla 3.** Promedios de concentraciones en partes por millón (ppm) de solubilización de fosfato.

| Solubilización de fosfato (ppm) |                                      |                                      |                                      |
|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Combinaciones                   | Concentración 10 <sup>8</sup> UFC/mL | Concentración 10 <sup>7</sup> UFC/mL | Concentración 10 <sup>6</sup> UFC/MI |
| 1+2                             | 548±7,8 <sup>f</sup>                 | 799±12,7 <sup>B</sup>                | 507±5,1 <sup>D</sup>                 |
| 1+3                             | 126±4,0 <sup>H</sup>                 | 165±12 <sup>I</sup>                  | 443±7,0 <sup>E</sup>                 |
| 1+4                             | 751±18,7 <sup>B</sup>                | 441±12,5 <sup>H</sup>                | 374±7,1 <sup>F</sup>                 |
| 2+3                             | 667±9,1 <sup>C</sup>                 | 696±13,6 <sup>D</sup>                | 716±10,3 <sup>A</sup>                |
| 2+4                             | 842±17 <sup>A</sup>                  | 837±19,1 <sup>A</sup>                | 723±8,3 <sup>A</sup>                 |
| 3+4                             | 529±3,2 <sup>F</sup>                 | 628±15 <sup>E</sup>                  | 517±9,0 <sup>D</sup>                 |
| 1+2+3                           | 680±17,6 <sup>C</sup>                | 742±11 <sup>C</sup>                  | 627±9,6 <sup>B</sup>                 |
| 1+2+4                           | 616±15 <sup>D</sup>                  | 702±11,5 <sup>D</sup>                | 528±9,5 <sup>D</sup>                 |
| 2+3+4                           | 591±10 <sup>ED</sup>                 | 588±11,5 <sup>F</sup>                | 729±9,8 <sup>A</sup>                 |
| 3+4+1                           | 621±12,5 <sup>D</sup>                | 507±10,1 <sup>G</sup>                | 464±7,8 <sup>F</sup>                 |
| 1                               | 117±9,1 <sup>H</sup>                 | 142±12,5 <sup>J</sup>                | 201±8,5 <sup>G</sup>                 |
| 2                               | 557±18,5 <sup>EF</sup>               | 416±15 <sup>H</sup>                  | 593±6,5 <sup>C</sup>                 |
| 3                               | 144±17,9 <sup>H</sup>                | 118±5,1 <sup>I</sup>                 | 166±10,5 <sup>H</sup>                |
| 4                               | 468±17,5 <sup>G</sup>                | 413±3,5 <sup>H</sup>                 | 535±9,0 <sup>D</sup>                 |

1. *Burkholderia cepacia*, 2. *Pantoea* sp, 3. *Pseudomona luteola*, 4. *Pseudomona* sp, Concentración en partes por millón ([ ] en PPM), a. Medias aritméticas ± desviación estándar de experimentos por triplicado. Los valores seguidos con letras superíndices distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según tukey.

**Tabla 4.** Efecto de los bioinoculantes en el crecimiento y desarrollo de plantas de pasto angletón (*Dichantium aristatum*).

| Tratamientos | Longitud de las plantas (cm) |                    | Cantidad de hojas |                  | Área foliar (cm <sup>2</sup> ) |                    | Longitud de raíz principal (cm) |                   | Peso seco (g)       |                      |
|--------------|------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
|              | 21 días                      | 35 días            | 21 días           | 35 días          | 21 días                        | 35 días            | 21 días                         | 35 días           | 21 días             | 35 días              |
| T1           | 19.3 <sup>A</sup>            | 30.33 <sup>A</sup> | 3.4 <sup>B</sup>  | 4.9 <sup>A</sup> | 321.7 <sup>A</sup>             | 536.1 <sup>B</sup> | 2.69 <sup>B</sup>               | 5.27 <sup>A</sup> | 0.0129 <sup>A</sup> | 0.09046 <sup>B</sup> |
| T2           | 24.44 <sup>A</sup>           | 38.04 <sup>A</sup> | 4.0 <sup>AB</sup> | 4.6 <sup>A</sup> | 443.1 <sup>A</sup>             | 858.6 <sup>A</sup> | 3.67 <sup>A</sup>               | 6.73 <sup>A</sup> | 0.0259 <sup>A</sup> | 0.162 <sup>A</sup>   |
| T3           | 26.42 <sup>A</sup>           | 45.88 <sup>A</sup> | 4.7 <sup>A</sup>  | 4.9 <sup>A</sup> | 491.5 <sup>A</sup>             | 859.1 <sup>A</sup> | 3.08 <sup>AB</sup>              | 5.29 <sup>A</sup> | 0.0205 <sup>A</sup> | 0.179 <sup>A</sup>   |

<sup>A,B</sup> Letras iguales no presentan diferencias significativas, con un alfa de 0.05. Los datos representan el promedio de 5 repeticiones. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas de forma independiente para cada tiempo en las diferentes variables. Tratamiento 1 (control): Semillas sin ningún tipo de tratamiento; Tratamiento 2: Semillas tratadas con el consorcio *Pantoea* sp + *Pseudomona* sp a la concentración 10<sup>8</sup> UFC/mL; Tratamiento 3: Semillas tratadas con fertilizantes comerciales fosfato diamónico (DAP) y Urea.

to del área foliar por la co-inoculación de rizobacterias de los géneros *Rhizobium* y *Pseudomonas* y el aumento del contenido de clorofila en plantas de fríjol chino (*Vigna radiata* L.).

Es importante resaltar que el efecto del tratamiento inoculado (T2) sobre el área foliar fue similar al tratamiento con fertilizante químico (T3), demostrándose los beneficios del consorcio nativo.

**Longitud de la raíz (cm):** Los resultados para este parámetro a los 21 días, evidencian una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la longitud de la raíz debido a que mostró diferencia entre los tratamiento T2 (semillas inoculadas) al compararse con T1 (testigo, semillas sin ningún tipo de tratamiento); el tratamiento T3 (semillas tratadas con fertilizantes comercial) fue similar a dos tratamientos. A los 35 días, el tratamiento T2 logró

una mayor longitud de raíz, con un valor superior a 6 cm, mientras que el tratamiento T1 y T3 mostró una longitud alrededor 5,27 cm; no se presentó diferencia significativa. El consorcio demostró efectos positivos sobre la longitud de la raíz que pueden ser atribuidos a la disponibilidad de Fósforo y también a la posible presencia de fitohormonas producidas por una o las dos cepas que forman el consorcio; la promoción del crecimiento ha sido atribuida a factores tales como la síntesis de ciertas hormonas vegetales que estimula la densidad y longitud de los pelos radicales aumentando así la cantidad de raíces en las plantas; se incrementa la capacidad de absorción de agua y nutrientes, y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Lara et al, 2011b; Kloepper et al., 1991).

**Peso seco (g):** Los pesos secos más altos se evidenciaron en los tratamientos T3 y T2, alcanzando un peso máximo de 0,179 g, un valor inferior se mostró en el tratamiento T1 con un peso entre 0,09 g. A los 35 días se observó diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) entre los tratamientos T2 y T3 frente al tratamiento testigo (T1) que presentó bajo peso seco. La asimilación de fosfatos por parte de los vegetales contribuye al aumento de su metabolismo, lo cual se refleja en mayor contenido de materia orgánica, crecimiento de las raíces en estado de plántula, acelera la maduración, estimula la coloración de los frutos, ayuda a la formación de semillas y de las moléculas de transferencia de energía como el ATP (Madigan et al., 2003; lañez, 2010).

La presencia de órganos de la planta con una demanda neta por asimilados, puede influenciar fuertemente los patrones de producción y distribución de materia seca (Tekalign y Hammes, 2005). La acumulación de materia seca, comúnmente se utiliza como parámetro para caracterizar el crecimiento, porque usualmente tiene un gran significado económico.

## Conclusiones

Los microorganismos en consorcios microbianos mostraron mayor capacidad de solubilizar fosfatos.

La aplicación de bioinoculantes a base de consorcios microbianos nativos solubilizadores de fosfatos en plantas de pastos angleton (*Dichantium aristatum*), representa un beneficio notable en diversos parámetros biométricos *área foliar*, *longitud de la raíz* y *peso seco*.

Los resultados obtenidos representan una gran alternativa para la sustitución parcial de fertilización química con buenos resultados para el crecimiento de las plantas de pastos Angleton, a bajo costo y de forma amigable con el ambiente para una producción más limpia.

## Agradecimientos

A la Universidad de Córdoba y COLCIENCIAS por financiar la ejecución del presente proyecto de investigación.

## Referencias bibliográficas

- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Khalid, M., Nazli, F., y Arshad, M. (2013). Efficacy of Rhizobium and Pseudomonas strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 170-176.
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163 (2), 173-181.
- Barragán, C., Zambrano, D., Pedroza, A., y Bobadilla, R. (2003). Producción de bacterias fosfato Solubilizadoras mediante fermentación discontinua en caldo de Pikovskaya modificado (Tesis de pregrado en Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Begonia, M., Begonia, G., Miller, G., Gilliard, D., y Young, C. (2004). La actividad fosfatasa y las poblaciones de microorganismos de cadmio y suelos contaminados con plomo. *Boletín de la contaminación ambiental y toxicología*, 73 (6), 1025-1032.
- Bobadilla, C y Rincon, S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de la plaza (Tesis de pregrado en Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Beltrán, S., Torrado, Y., Martínez, M., y Matiz, A. (2005). Aislamiento de bacterias con actividad fosfato solubilizadora a partir de suelos ácidos del norte de Boyacá y producción de un inóculo mixto en fermentación discontinua (Tesis de pregrado en Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Cordero, P., Ortega, P., y Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 111 - 121.
- Cuadrado, H., Mejía, S., Contreras, A., Romero, A., y García, J. (2003). Manejo agronómico de algunos cultivos forrajeros y técnicas para su conservación en la región Caribe colombiana. *Corpoica, Bogotá*.
- Coyne, M., (2000). Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio. Barcelona, España: Editorial Paraninfo.
- Degiovanni, V., Gómez, J., y Sierra, J. (2004). Análisis de crecimiento y etapas de desarrollo de tres variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en Montería, Córdoba. *Temas Agrarios*, 9(1), 21-29.
- Echeverri, R., y Castilla, A. (2008). Biofertilizantes como mejoradores del proceso de nutrición del arroz. *Revista Arroz*, 56(474), 12-27.
- Fernandez, L., Zalba, P., Gomez, M., y Sagardoy, M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*, 23(1), 31-37.
- Galvis, G y Lara, C. (2013). Evaluación del contenido de nitrógeno y parámetros biométricos en pastos Angleton inoculados con una cepa nativa del género *Azotobacter* sp. secretora de ácido indolacético (AIA) y fijadora de nitrógeno (Tesis de pregrado Programa de Química). Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Guzmán, E. (2012). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo (Tesis Ingeniería agronómica). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, P., y Reddy, G. (2006). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*, 163(2), 234-242.
- Hernández, A. (2002). Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.) (Tesis de doctorado). Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.
- lañez, E. (2010). Microbiología General. Recuperado de <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>.
- Kitson, R., y Mellon, M. (1944). Colorimetric determination of phosphorus as molybdovanado phosphoric acid. *Ind Eng Chem Anal*, 16, 379- 384.

- Kumar, V., y Narula, N. (1999). Solubilization of organic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Soil Fertile Soils*, 28, 301-305.
- Kloepper, J., Zablutowicz, R., Tipping, E., y Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The Rhizosphere and Plant Growth*, 30, 315-326.
- Lara, C., Esquivel, L., y Negrete, J. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- Lara, C., García, L., y Oviedo, L. (2011). Efecto biofertilizante del preparado: Residuos vegetales-bacteria nativa diazotrofa sobre las variables biométricas de plántulas de *Rhaphanus sativus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 156-162.
- López, M. (2010). Manejo agroecológico del sistema sorgo-frijol, efecto sobre la fertilidad del suelo y microorganismos con potencial para biofertilizar agroecosistemas venezolanos (Tesis de doctorado en Ciencia del Suelo). Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (ed.). (2003). Brock, Biología de los microorganismos. Madrid, España: Editorial Prentice Hall-Pearson Education Inc.
- Mayak, S., Tirosh, T., y Glick, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572.
- Moreno, B; Díez, V; García, M; Menes, L; Gutiérrez, M; Polledo, F. (2000). Comisión internacional de especificaciones microbiológicas alimentarias. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170 (1), 265-270.
- Navarro, S., y Navarro, G. (2003). Química Agrícola. Madrid, España: Editorial Mundi-prensa.
- Pastor, K., y Lara, C. (2013). Evaluación de biopreparados a base de una cepa nativa del género *azotobacter* sp, a diferentes concentraciones, sobre las variables biométricas en pasto angletón (*dichanthium aristatum* benth) (Tesis de grado de Maestría en Biotecnología). Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Osorio, A., y Lara, C. (2013). Evaluación del potencial biofertilizante de tres cepas de los géneros *panthoea* y *azotobacter*, aisladas de los suelos de Córdoba, sobre el crecimiento de plántulas de rábano (*raphanus sativus* L.) (Tesis de grado de Maestría en Biotecnología). Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Rajkumar, M., Nagendran, R., Jae, K., Hyu, W., y Zoo, S. (2006). Influence of plant growth promoting bacteria and Cr 6+ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*, 62 (5), 741-748.
- Ramirez, R., y Perez, A. (2006). Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 59 (2):3543-3556.
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología aplicada*, 5(1-2), 87-91.
- Seeley, H., y Van demark, P. (1973). Microbios en acción: Manual de Laboratorio para Microbiología. Madrid, España: Editorial Blume.
- Tekalign, T., y Hammes, P. S. (2005). Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth: II. Growth analysis, tuber yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 105 (1), 29-44.
- Wu, S., Cao, Z., Li, Z., Cheung, M., Wong, W. (2005). Wu, Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1), 155-166.

## Proceder de la innovación en la industria farmacéutica. El caso de España

### Proceed to the innovation in the pharmaceutical industry. The case of Spain

*Aída Salazar García\**; *Elicet Cruz Jiménez\*\**; *Joaquim Lloveras Macia\*\*\**;  
*Guillermo Urriolagoitia Calderón\*\*\*\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50691

#### Resumen

El presente artículo explora sectores que identifican la innovación en empresas farmacéuticas de España. Para ello se consideran firmas nacionales y filiales extranjeras establecidas en territorio nacional. El análisis realizado comprende el periodo de 2009 al 2011 para una población N=200 empresas afiliadas en ese momento a Farmaindustria y al Plan Profarma. El trabajo consistió en una búsqueda de información útil en las páginas web de las empresas farmacéuticas establecidas en España que pudieran describir de forma estática el perfil innovador del sector farmacéutico español a través del análisis estadístico descriptivo. De esta forma, se crea un cimiento para la documentación de los resultados en una base de datos con el propósito de obtener un panorama con determinación sobre el comportamiento del sector farmacéutico español, así como posibles tendencias.

El alto contenido de aportación literaria sobre el sector farmacéutico, se expresa de forma globalizada a nivel nacional e internacional, desestimando datos e información que pudieran ofrecer señales de amenaza u oportunidad respecto al corto periodo de tiempo, ya que a su vez son equiparables a otros años puesto que la industria farmacéutica española se constituyere por empresas de origen extranjero (50.5%) y de capital nacional (49.5%). De éstas últimas las pymes son las protagonistas de las pequeñas innovaciones de las firmas establecidas en Madrid y Barcelona principalmente.

**Palabras clave:** innovación, industria farmacéutica, I+D, empresas

#### Abstract

This article explores sectors identified innovation in Spanish pharmaceutical companies. It also considers domestic firms and foreign subsidiaries in the country. The analysis covers the period 2009 to 2011 for a population N=200 affiliates at that time Farmaindustria and Plan Profarma. The work involved a search of useful information on the websites of pharmaceutical companies based in Spain statically describes the innovative profile of the Spanish pharmaceutical through descriptive statistical analysis. Thus a foundation for documenting the results in a database in order to get a picture with determination on the behavior of Spanish pharmaceutical sector and possible trends is created.

The high content of literary contribution on the pharmaceutical sector is expressed in a globalized national and international level, rejecting data and information that could provide signals threat or opportunity regarding short period time, and which in turn are comparable to other years since the Spanish pharmaceutical industry is constituted by companies of foreign

\* cPhD Departament de Projectes d'Enginyeria. Universitat Politècnica de Catalunya. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (ETSEIB) Ave Diagonal 647, planta 10, 08028 Barcelona, España. Tel:(+34) 66 37 037 63 email: aida.salazar@estudiant.upc.edu

\*\* PhD ingeniería industrial de la Universidad Politécnica de Cataluña y Directora técnica en IALE Tecnología. Balmes 48, 2º, 1ra, 08007 Barcelona, España. Tel (+34) 93 208 06 11 email: elicet@iale.es

\*\*\* PhD., Ingeniero Industrial. Coordinador del programa de doctorado de Proyectos de Innovación Tecnológica en la ingeniería de producto y proceso de la Universitat Politècnica de Catalunya; Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (ETSEIB) Av. Diagonal, 647. Planta 10. 08028. Barcelona, España. Tel: (+34) 93 402 66 42 email: j.lloveras@upc.edu

\*\*\*\* PhD Ingeniería mecánica y profesor del Instituto Politécnico Nacional (IPN) Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (ESIME-Zacatenco). Sección de Estudios de Posgrado e Investigación (SEPI). Unidad profesional "Adolfo López Mateos," Edificio 5, 3er piso, Colonia Lindavista. Gustavo A. Madero 07738 México, D.F. Tel:(+5255) 57 29 6000 Ext 54740; email: urrio332@hotmail.com

origin (50.5%) and domestic capital (49.5%). Of the latter SMEs are the protagonists of small innovations established in Madrid and Barcelona mainly.

**Key word:** innovation, pharmaceutical industry, R&D, companies.

**Recibido:** octubre 18 de 2014

**Aprobado:** abril 20 de 2015

## Introducción

El presente trabajo presenta una investigación orientada al comportamiento de la innovación en la industria farmacéutica conforme a sus características y atributos. En España, la innovación surge a partir de la expansión por crear un bien o servicio, o la significativa mejora de lo que ya existe. Los fármacos fabricados por empresas farmacéuticas, se han relacionados con el desarrollo de una comunidad, al ser requeridos por su contribución al estado de salud (Formichella, 2005; OECD & Eurostat, 2005).

El protagonismo de esta industria ha estimulado realizar una revisión de la información pública de empresas farmacéuticas establecidas en territorio español afiliadas a Farmaindustria y al Plan Profarma (2010) durante el periodo 2009 a 2011 (el Plan Profarma es un programa conjunto del Ministerio de industria, energía y turismo que tiene el objetivo de aumentar la competitividad de la industria farmacéutica en España). Lo anterior motivado por el profundo contenido literario a través de diversas fuentes de información que ofrecen un compendio de cifras sobre el sector farmacéutico de un país, un grupo de países, de un continente, o del sector farmacéutico mismo de forma general, dentro del cual incita a explorar de modo particular lo que su-

cede en un país, junto con la interacción que sostiene como parte de la comunidad Europea.

En consecuencia, la información se introdujo en una base de datos creada con el propósito de evaluar el perfil innovador de las empresas de género farmacéutico. En otros estudios realizados al sector farmacéutico en España se ha utilizado el cuestionario como herramienta de investigación alcanzando aceptación limitada y, en algunos casos el resultado ha revelado bajo índice de respuesta. Por ejemplo un 4,23 % (García, 1995; Piña, 2007).

Primero, se utilizó la literatura como instrumento para obtener información que ayude al proceso de toma de decisiones (Ortíz, 2003; Zaintek, 2003). Los datos encontrados fueron sometidos a un tratamiento de filtrado por Comunidad Autónoma (CCAA), además del sector de actividad económica, número de empleados y áreas terapéuticas entre otros, dentro de los cuales se pueden señalar características del comportamiento innovador durante el periodo de estudio, así como, las señales de oportunidad y amenaza. Adicional a ello, el Instituto Nacional de Estadística (INE) publica de forma anual, los sectores industriales más innovadores de España, que de acuerdo al comparativo 2008 - 2012, se observa un descenso en la industria farmacéutica relativo al número de empresas innovadoras (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Comparativo de empresas innovadoras en España por rama d de actividad 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012

| Industria: Farmacia (CNAE 21) / Año                       | 2008      | 2009      | 2010      | 2011      | 2012      |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Fabricación de productos farmacéuticos de base            | 84        | 71        | 73        | 78        | 84        |
| Fabricación de especialidades farmacéuticas               | 228       | 218       | 227       | 217       | 198       |
| Empresas innovadora total                                 | 171       | 188       | 185       | 158       | 146       |
| Empresas innovadoras %                                    | 66,94     | 75,05     | 73,09     | 64,33     | 62,24     |
| Gastos en innovación: Total (miles de euros)              | 1.069.179 | 1.097.116 | 1.108.587 | 1.115.516 | 1.127.623 |
| % de la cifra de negocios en productos nuevos y mejorados | 27,99     | 32,90     | 27,42     | 22,68     | 17,88     |

**Fuente:** INE Instituto Nacional de Estadística (INE 2013a)

La tabla 1 presenta cifras de empresas innovadoras que fabrican especialidades farmacéuticas de acuerdo a la Clasificación Nacional de Actividades Económicas de España (CNAE 21.2) (INE, 2013b), como una referencia apropiada para contrastar las empresas que durante el periodo de análisis, el país se encontraba en crisis financiera, dentro de la cual se reflejó un aumento de poder de mercado al continuar presentes las empresas a pesar de la reducción en los números de cada año.

Las especialidades farmacéuticas hacen referencia al medicamento de composición e información definidas, de forma farmacéutica y dosificación determinada, preparado para su uso medicinal inmediato, dispuesto y acondicionado para su venta al público con denominación, empaque, envase y etiquetado según la autorización sanitaria (INE, 2013b; Tait, 2001).

Este trabajo muestra las ventajas sobre el sector industrial farmacéutico nacional, las oportunidades que se pueden detectar con ayuda de información disponible sobre el entorno de estudio al igual que las posibles contingencias de amenazas. Entre ellas el número de empresas nacionales y extranjeras y la cifra de ventas anuales, entre otros. Sin embargo, el sector farmacéutico es clasificado como sector innovador. Por lo que se razonan las características que exhiben las empresas para definir su perfil innovador de forma habitual (INE, 2013a).

De este modo la selección de variables se centró en obtener información que reflejara las oportunidades y amenazas del sector farmacéutico en España a corto y mediano plazo (1-3 años) con una perspectiva elemental de un estudio de estática comparativa.

El alcance establecido en este análisis, engloba determinar información relevante que sugiera señales de un acontecimiento, de acuerdo al comportamiento mostrado por la industria farmacéutica española en un periodo de tiempo.

## Metodología

Las empresas y laboratorios farmacéuticos ubicados en territorio español son los actores principales de éste trabajo, dentro de los cuales se constituye de N=200 empresas nacionales e internacionales que representan el 100 % de la población. Este porcentaje involucra las empresas que en el periodo de análisis se encontraban afiliadas a Farmaindustria y al plan profarma.

Las empresas que integran la población, han sido estimadas sin restricciones en relación al tamaño de la organización o al tipo de actividad económica que ésta desarrolle como empresa matriz o filial extranjera, con el objetivo de poder emitir un argumento analítico que admita el mayor número de empresas del género en estudio.

El muestreo no probabilístico o no aleatorio para este trabajo es de tipo intencional. Es decir, que los ele-

mentos son elegidos con base en criterios o juicios preestablecidos por el investigador. En este caso, el tipo de muestreo fue elegido de acuerdo al tipo de análisis estático comparativo obteniendo ventaja de la población finita, de tamaño reducido y además conocida. Por lo tanto, la fórmula empleada para determinar la muestra cuando el tamaño de la población es conocida, se describe a continuación de acuerdo con Vallejo, (2011).

$$n = \frac{N}{1 + \frac{e^2(N-1)}{z^2 pq}}$$

- n** = tamaño de la muestra que deseamos conocer,
- N** = tamaño conocido de la población,
- z** = Valor de z correspondiente al nivel de confianza. Un nivel de confianza del 95% (también se expresa así:  $\alpha = 0.05$ ) correspondiente a  $z = 1.96$  sigmas o errores típicos.
- e** = es el margen de error y significa error o desviación posible que se acepta, y no debe ser superior a 0.05 (5%) para que los resultados sean realmente informativos y útiles
- pq** = varianza de la población, como se desconoce, se pone la varianza mayor posible suponiendo que la mitad responda un sí y el otro 50% un no =  $(0.50)(0.50) = 0.25$  (es una constante).

El tamaño necesario de la muestra para estimar confiable el instrumento de medición en este análisis, corresponde a n=132 observaciones para una población N=200 elementos, manteniendo así, un margen de error del 5% y nivel de confianza del 95%. En este aspecto, el valor de la población, hace válido el instrumento de creación de base de datos de empresas farmacéuticas españolas.

Una vez realizado el muestreo, las empresas objeto del estudio fueron identificadas a través de los sitios web, de donde se obtuvo información que a su vez se guardó en una base de datos para empresas farmacéuticas de España. La base de datos despliega en su contenido campos a documentar de las características y atributos de las variables seleccionadas acorde al Manual de Oslo, (2005) y, al Manual de Frascati, (2002). Por último, el Sistema de Análisis de Balances Ibéricos SABI, (2012) se utilizó como herramienta de consulta sobre la información contable anual que las empresas españolas depositan en los registros clasificados de acuerdo al Código Nacional de Actividades Económicas (CNAE).

## Diseño

En este trabajo se definen tres secciones consideradas para el análisis cualitativo y cuantitativo de innovación en las empresas farmacéuticas españolas. Cada una contiene variables elegidas con el objetivo de obtener

la información de utilidad en una revisión específica del sector en estudio de España con la que se pueda emitir un dictamen fundamentado en resultados previos e históricos (ver tablas 2, 3, y 4).

La sección nombrada *Datos Generales de la empresa*, proporciona el conjunto de características y atributos de las farmacéuticas, además de referir algunas de sus funcionalidades (ver tabla 2). Siguiendo un modelo *cualitativo* se describen: 1. Los datos y principales fuentes de obtención, 2. La transcripción y estructuración de información en una base de datos y 3. La codificación de información en tres niveles (empresas nacionales, europeas y del resto del mundo). Mientras que el modelo *cuantitativo* es descriptivo estático (Fernández, 2006).

El tipo de variable empleada, difiere en cada sección, y para ello se agruparon según su tipo. En relación a la escala de medición para las variables cualitativas, las dicotómicas y politómicas son de tipo "nominal u ordinal" al igual que las cuantitativas, y las continuas son de tipo ordinal. A su vez representan un conjunto de variables independientes agrupadas en cada sección.

Dentro del tipo de productos principales, se encuentra la *parafarmacia*, (productos que no son medicamentos pero de igual forma se consumen o utilizan por el ser humano para contribuir a cuidar la salud de las personas) (Portalfarma 2012).

La sección de *Innovación*, representa aspectos que investigan parte de la actividad innovadora de las empresas farmacéuticas e identifica aspectos fuertes y débiles de la misma. Además, reconoce las principales áreas terapéuticas en las que incursionan las empresas,

por lo tanto la información que se obtenga servirán para evaluar un aspecto del esfuerzo innovador que realizan las farmacéuticas en España.

*Varios*, como última sección, se refieren al ámbito de operaciones que identifica la zona geográfica destino de los productos fabricados por las firmas farmacéuticas.

En este sentido la *internacionalización*, ha considerado los cinco continentes (Europa, África, Asia, Oceanía y América), además de España y los Estados Unidos de Norteamérica por separado, al percibir que la literatura que engloba la connotación de *América*, pudiera crear confusión al asociar sólo los Estados Unidos de Norteamérica o bien considerar todos los países que se ubican geográficamente en el continente americano desde Groenlandia hasta Chile y Argentina.

### Procedimiento

Primero, se obtuvo la lista de empresas farmacéuticas asociadas al Plan Profarma (2009) y Farmaindustria (2010) en el periodo de tiempo estudiado. Segundo, en base al Manual de Oslo (OECD & Eurostat, 2005) y de Frascatti (OECD, 2002), se seleccionaron variables que despertaran interés por el contenido de valor que ofrecen, ya que la información en su conjunto sirve a los tomadores de decisiones involucrados en el sector. Tercero, se creó una base de datos de empresas farmacéuticas establecidas en territorio español. Una vez documentada la base de datos, se realizó un tratamiento de datos usando filtros para obtener datos cuantitativos precisos que se traducen en diagramas y mapas.

**Tabla 2.** Indicador y variables con information general de la empresa.

| Sección 1                     | Variables (características y atributos)   |
|-------------------------------|---|
| Datos Generales de la empresa | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clase de empresa (Nacional, UE, Extranjera fuera de la UE)</li> <li>• CC.AA. donde se ubica</li> <li>• Pertenece a un grupo empresarial (Estructura de propiedad)</li> <li>• Página web</li> <li>• Tamaño de la empresa</li> <li>• Cotiza en Bolsa de valores</li> </ul> |
|                               | Tipo de Actividad que ejerce  |

**Tabla 3.** Indicador de Innovación y las variables que describirán el esfuerzo innovador de las empresas.

| Sección 2  | Variables (características y atributos)  |
|------------|--|
| Innovación | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Año de fundación</li> <li>• Realiza actividades de I+D</li> <li>• Ventas millones de euros</li> <li>• ¿Se ha fusionado la empresa?</li> <li>• Gasto en I+D anual</li> </ul> |
|            | Áreas Terapéuticas   |

**Tabla 4.** Se muestra el grado de internacionalización de los productos farmacéuticos nacionales e internacionales.

| Sección 3 | Variables (características y atributos)                              |
|-----------|--|
| Varios    | Continentes con presencia de los Laboratorios (Internacionalización) |

**Tabla 5.** Variables y sus características analizadas.

| País           | No. labos | Fr         | %            | No. empleados | emp. micro | emp. peque | emp. med  | emp. gde | emp. NA    | Fabric    | Distrib   | Venta     | Com/venta  | Comercia   | Farma     | celulicos | Parafarmacia | Cosméticos | Veterinarios | Genéricos  | por_employed | España    | USA        | América   | Europa    | Asia      | Africa    | Australia | Digestivo | Sangre_Org_ | Cardio    | Derma     | Genito_U  | Hormonas  | Anti Infec | Anti neoplási | A. Locomotor | SNC       | Respira   | Org. sentidos | Agren |
|----------------|-----------|------------|--------------|---------------|------------|------------|-----------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|---------------|--------------|-----------|-----------|---------------|-------|
| España         | 99        | 0,495      | 49,5         | 15793         | 26         | 39         | 16        | 15       | 3          | 81        | 29        | 29        | 11         | 54         | 90        | 52        | 36           | 28         | 7            | 38,159325  | 60           | 15        | 29         | 51        | 23        | 5         | 12        | 0         | 9         | 22          | 35        | 20        | 2         | 22        | 22         | 20            | 20           | 32        | 20        | 7             |       |
| Italia         | 13        | 0,065      | 6,5          | 1894          | 0          | 3          | 7         | 3        | 0          | 11        | 6         | 6         | 1          | 9          | 13        | 8         | 7            | 4          | 1            | 4,576316   | 9            | 4         | 5          | 8         | 6         | 1         | 0         | 9         | 1         | 7           | 5         | 4         | 1         | 4         | 4          | 10            | 5            | 8         | 1         | 0             |       |
| Portugal       | 2         | 0,01       | 1            | 769           | 0          | 0          | 1         | 1        | 0          | 2         | 0         | 2         | 0          | 1          | 2         | 2         | 1            | 0          | 0            | 1,858071   | 2            | 0         | 2          | 2         | 2         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1           | 0         | 0         | 0         | 0         | 1          | 1             | 1            | 2         | 0         | 0             |       |
| Alemania       | 11        | 0,055      | 5,5          | 4716          | 1          | 5          | 2         | 3        | 0          | 6         | 3         | 6         | 1          | 9          | 10        | 3         | 4            | 3          | 1            | 11,394882  | 9            | 6         | 7          | 9         | 7         | 0         | 6         | 6         | 0         | 4           | 5         | 1         | 3         | 3         | 3          | 6             | 6            | 5         | 2         | 0             |       |
| Rep Checa      | 1         | 0,005      | 0,5          | 33            | 0          | 1          | 0         | 0        | 0          | 0         | 1         | 0         | 0          | 1          | 1         | 1         | 1            | 0          | 0            | 0,079735   | 1            | 1         | 1          | 1         | 1         | 0         | 1         | 1         | 0         | 0           | 0         | 1         | 0         | 0         | 1          | 1             | 1            | 1         | 0         | 0             |       |
| Dinamarca      | 4         | 0,02       | 2            | 701           | 0          | 0          | 2         | 2        | 0          | 3         | 2         | 4         | 0          | 3          | 4         | 2         | 1            | 3          | 0            | 1,693769   | 3            | 3         | 3          | 3         | 3         | 0         | 2         | 1         | 1         | 0           | 3         | 0         | 1         | 2         | 2          | 0             | 1            | 1         | 0         | 0             |       |
| Reino Unido    | 6         | 0,03       | 3            | 674           | 1          | 2          | 2         | 1        | 0          | 1         | 2         | 2         | 1          | 5          | 5         | 4         | 3            | 0          | 0            | 1,628531   | 5            | 5         | 3          | 6         | 4         | 2         | 4         | 2         | 1         | 3           | 2         | 2         | 0         | 1         | 5          | 4             | 1            | 4         | 1         | 1             |       |
| Austria        | 1         | 0,005      | 0,5          | 123           | 0          | 0          | 1         | 0        | 0          | 1         | 0         | 0         | 1          | 1          | 1         | 0         | 0            | 0          | 0            | 0,297195   | 1            | 0         | 0          | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0           | 1         | 1         | 0         | 0         | 0          | 1             | 1            | 1         | 0         | 0             | 0     |
| Francia        | 13        | 0,065      | 6,5          | 3523          | 1          | 6          | 2         | 4        | 0          | 10        | 7         | 5         | 2          | 10         | 10        | 2         | 3            | 2          | 0            | 8,512335   | 10           | 7         | 8          | 10        | 9         | 3         | 6         | 6         | 5         | 6           | 2         | 2         | 1         | 2         | 7          | 6             | 7            | 3         | 1         | 3             |       |
| Holanda        | 1         | 0,005      | 0,5          | 10            | 1          | 0          | 0         | 0        | 0          | 1         | 0         | 0         | 0          | 1          | 1         | 1         | 1            | 1          | 0            | 0,024162   | 1            | 0         | 0          | 1         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0           | 0         | 0         | 0         | 0         | 1          | 0             | 0            | 1         | 0         | 1             |       |
| Estados Unidos | 20        | 0,1        | 10           | 7840          | 3          | 3          | 4         | 10       | 0          | 11        | 6         | 9         | 0          | 17         | 20        | 6         | 5            | 7          | 3            | 18,943146  | 19           | 19        | 18         | 18        | 15        | 1         | 11        | 13        | 5         | 9           | 7         | 5         | 5         | 9         | 11         | 14            | 8            | 9         | 6         | 3             |       |
| Suecia         | 8         | 0,04       | 4            | 833           | 0          | 5          | 1         | 1        | 1          | 4         | 1         | 3         | 1          | 5          | 8         | 3         | 2            | 0          | 0            | 2,012709   | 2            | 2         | 2          | 2         | 2         | 0         | 2         | 2         | 0         | 1           | 0         | 1         | 1         | 1         | 1          | 2             | 1            | 1         | 0         | 0             |       |
| Bélgica        | 2         | 0,01       | 1            | 240           | 0          | 0          | 0         | 2        | 0          | 2         | 0         | 2         | 0          | 2          | 2         | 1         | 0            | 0          | 0            | 0,579892   | 2            | 2         | 2          | 2         | 2         | 1         | 2         | 0         | 1         | 1           | 0         | 1         | 0         | 1         | 2          | 2             | 2            | 0         | 0         | 1             |       |
| Japón          | 6         | 0,03       | 3            | 1090          | 0          | 0          | 3         | 3        | 0          | 5         | 2         | 3         | 2          | 3          | 6         | 4         | 2            | 1          | 1            | 2,633677   | 6            | 5         | 5          | 6         | 6         | 1         | 3         | 4         | 1         | 5           | 3         | 2         | 1         | 3         | 5          | 3             | 5            | 4         | 2         | 0             |       |
| Suiza          | 9         | 0,045      | 4,5          | 2521          | 0          | 4          | 1         | 4        | 0          | 9         | 1         | 6         | 1          | 4          | 8         | 5         | 6            | 2          | 2            | 6,091285   | 5            | 4         | 5          | 5         | 5         | 0         | 4         | 4         | 1         | 2           | 5         | 2         | 0         | 4         | 3          | 3             | 2            | 4         | 4         | 0             |       |
| Israel         | 1         | 0,005      | 0,5          | 500           | 0          | 0          | 0         | 1        | 0          | 1         | 1         | 1         | 0          | 0          | 1         | 0         | 0            | 1          | 1            | 1,208109   | 1            | 1         | 1          | 1         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0           | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 1             | 0            | 1         | 1         | 0             | 0     |
| Argentina      | 2         | 0,01       | 1            | 79            | 0          | 1          | 0         | 0        | 1          | 1         | 0         | 0         | 0          | 2          | 2         | 1         | 1            | 0          | 1            | 0,190881   | 1            | 0         | 2          | 2         | 0         | 0         | 0         | 1         | 1         | 0           | 2         | 0         | 0         | 1         | 0          | 1             | 2            | 2         | 1         | 0             |       |
| Islandia       | 1         | 0,005      | 0,5          | 48            | 0          | 1          | 0         | 0        | 0          | 1         | 1         | 0         | 1          | 1          | 1         | 0         | 0            | 0          | 1            | 0,115978   | 1            | 0         | 0          | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1           | 0         | 0         | 0         | 1         | 0          | 1             | 1            | 0         | 0         | 0             |       |
| <b>200</b>     | <b>1</b>  | <b>100</b> | <b>41387</b> | <b>33</b>     | <b>70</b>  | <b>42</b>  | <b>50</b> | <b>5</b> | <b>150</b> | <b>62</b> | <b>78</b> | <b>22</b> | <b>128</b> | <b>185</b> | <b>95</b> | <b>73</b> | <b>52</b>    | <b>18</b>  | <b>100</b>   | <b>138</b> | <b>74</b>    | <b>93</b> | <b>129</b> | <b>87</b> | <b>14</b> | <b>53</b> | <b>87</b> | <b>26</b> | <b>63</b> | <b>70</b>   | <b>41</b> | <b>15</b> | <b>54</b> | <b>70</b> | <b>75</b>  | <b>65</b>     | <b>78</b>    | <b>38</b> | <b>16</b> |               |       |

El filtrado consistió en eliminar los casos con valores perdidos o asignar un valor estimado a los mismos y así contabilizar, obtener promedios y porcentajes. De esta manera, el tratamiento contribuyó para identificar empresas que realizan I+D por ejemplo. Puesto que se ha establecido por instituciones como el *INE* y *Farmaindustria* ser uno de los índices vinculado con el grado de innovación de una empresa. Por esta razón, asociaciones que ejercen I+D constituyen un factor fundamental en la competitividad y crecimiento de una economía.

### Resultados y discusión

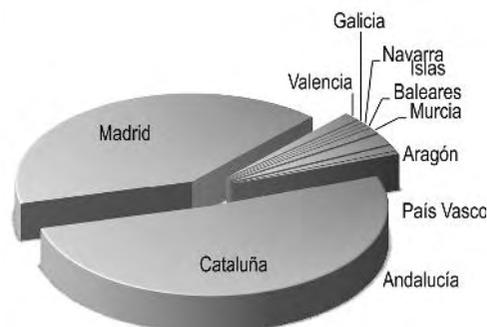
A continuación, se exponen los resultados en tablas y figuras donde se destacan valores importantes a considerar en un proceso de toma de decisiones.

Partiendo de las variables de la sección *Datos generales*, se encontró lo siguiente.

- La clase de empresa se refiere al origen geográfico. Sobre esta característica se identificaron empresas nacionales n=99 e internacionales con n=101. De acuerdo con el tratamiento de datos, las empresas internacionales se clasificaron según el país de

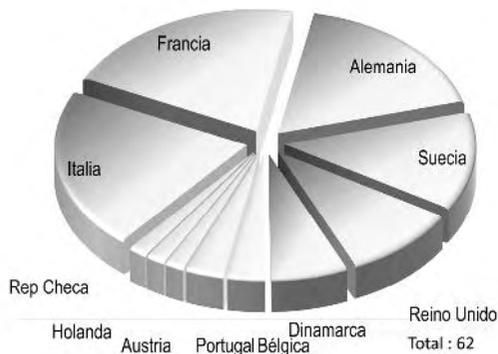
origen de la filial, tanto de la Unión Europea (UE) como del Resto del Mundo (RM).

En la figura 1 se observa que el conjunto de empresas del análisis N=200, y su localización, de las cuales la mayor proporción se encuentra en las comunidades de Madrid y Cataluña.



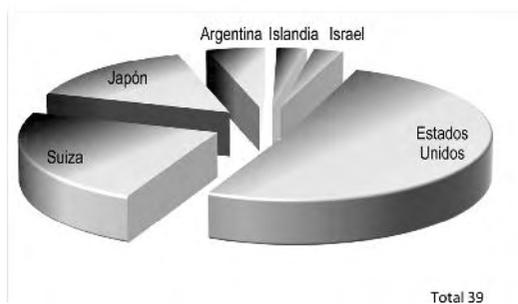
**Figura 1.** Distribución de empresas farmacéuticas nacionales y extranjeras localizadas en España por Comunidad Autónoma.

En la parte internacional, la UE sobresalen países como Italia, Francia, Alemania, Suecia y Reino Unido con más de cinco firmas farmacéuticas cada país. En conjunto representa el 31% de la población analizada (ver figura 2).



**Figura 2.** Promedio de empresas farmacéuticas internacionales con origen en países de la Unión Europea.

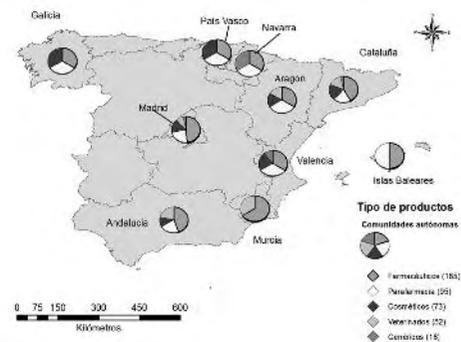
Mientras tanto, los países del resto del mundo (RM), tienen influencia en España del 19,5 % de la población analizada. Dentro de lo cual se presentan potencias de dominio en la industria farmacéutica conformadas por EE.UU., Suiza y Japón al escenificar tres continentes América, Europa y Asia (ver figura 3). Geográficamente, Suiza se localiza en Europa central, pero no pertenece al espacio económico del euro, por lo tanto corresponde al sector de países del RM para este trabajo.



**Figura 3.** Promedio de empresas farmacéuticas internacionales con origen en países fuera de la Unión Europea (Resto del mundo).

- Se identificó que el 25 % de la muestra analizada mantiene una *estructura de propiedad*. Es decir, que pertenecen a un grupo empresarial. En el caso de firmas nacionales las micro empresas y pymes que forman parte de un grupo empresarial comparten el mismo sitio web. Únicamente el 9 % de casos no cuentan con información pública, recurriendo a otras fuentes disponibles como la base de datos SABI, (2012) para consultar.

- El *tamaño de la empresa* fue considerado en base al volumen de ventas anual y al número de empleados. De acuerdo con los resultados las empresas nacionales e internacionales durante el periodo de tiempo analizado, comprenden casi el mismo número de empresas en ambas categorías. Por otra parte, la industria farmacéutica española se compone principalmente por micro empresas, pequeñas y medianas. Las grandes empresas constituyen un elevado porcentaje de empresas extranjeras (ver tabla 6 y tabla 7).
- El *sector de actividad* y el *tipo de productos* que se trabaja en las farmacéuticas de España, se expone a nivel nacional y extranjero. (ver tabla 6 y tabla 7). Por un lado la tabla 6 señala el tipo de variable que corresponde, y por otro, las figura 4 y 5 lo exponen en el mapa para su mejor ubicación visual.



**Figura 4.** Distribución geográfica según el tipo de producto que se produce en las firmas farmacéuticas de España.



**Figura 5.** Distribución geográfica según el sector de actividad económica que desempeñan las empresas farmacéuticas de España.

- Las empresas nacionales y del RM se han inclinado más a la importación que exportación, de modo que ofrece una posición de déficit a sus países. Sin embargo, este fenómeno participa en otros sectores industriales del país, y el evento contrario: de

superávit, se reflejaría en diversas inversiones de la organización como en I+D, capacitación, reclutamiento y otros.

- El número de empresas que cotiza en bolsa de valores corresponde al 7,5% de la población analizada.

Los resultados de la segunda sección refieren a:

- La cifra correspondiente a la venta en millones de euros. Por un lado, puede alertar el poder negociador de la empresa frente a proveedores y distribuidores. Por otro lado, puede clasificar el tamaño de empresa por sus ingresos a pesar de no ser un indicador de innovación pero es de utilidad para observar las características de las firmas con perfil innovador.
- La fundación de empresas del sector farmacéutico español tuvo su auge durante el siglo XX. En este aspecto vale la pena mencionar que sólo el 17 % de la población indicó el año en que inició operaciones en España.
- Las actividades de I+D, hacen referencia al conjunto de labores realizadas por las farmacéuticas con el propósito de obtener nuevos productos innovadores. Por ejemplo: las dianas (molécula que desempeña una función esencial en una enfermedad que se transforman en un nuevo medicamento) (Amgen, 2013). Con este rigor, se identificaron 28 empresas nacionales en Barcelona, 15 en Madrid y 8 restantes en las demás comunidades antes señaladas. El acervo de empresas representa el 25 % de la población analizada y el 53,53 % de las firmas nacionales que realizan I+D (ver figura 6). Las firmas nacionales que registraron actividad innovadoras, tienen presencia a través de sus productos en Europa, América, Asia, África, EE.UU y Australia, en ese orden.

Mientras tanto, la comunidad internacional de firmas farmacéuticas que realizan I+D comprenden el 36 % de la población, que es equivalente a 42 empresas de la UE y 30 empresas del RM (ver figura 7).

Dada la naturaleza del sector farmacéutico y su relación con las innovaciones, ambas mantienen una fuerte influencia en diversos países. Sobre todo por el impacto, el desempeño y la capacidad para resolver problemas dentro del sector salud. El cual se encuentra vinculado a su capacidad innovadora o a su estrategia de imitación (Guzmán, 2004).



Figura 6. Empresas farmacéuticas nacionales que practican I+D.



Figura 7. Países que practican I+D en sus empresas farmacéuticas de España.

Tabla 6. Número de empresas farmacéuticas por región y características.

|                          |             | Nacional         | UE | RM | Σ   | Fr  | %     |      |
|--------------------------|-------------|------------------|----|----|-----|-----|-------|------|
| Número de empresas total |             | 99               | 62 | 39 | 200 |     |       |      |
| Variables políticas      | Tamaño      | Micro            | 26 | 4  | 3   | 33  | 0,165 | 16,5 |
|                          |             | Pymes            | 56 | 39 | 17  | 112 | 0,56  | 56   |
|                          |             | Grandes          | 15 | 18 | 17  | 50  | 0,25  | 25   |
|                          |             | n/a              | 3  | 1  | 1   | 5   | 0,025 | 2,5  |
|                          | Actividades | Fabricación      | 81 | 41 | 28  | 150 | 0,75  | 75   |
|                          |             | Distribución     | 29 | 22 | 11  | 62  | 0,31  | 31   |
|                          |             | Venta            | 29 | 39 | 19  | 87  | 0,435 | 43,5 |
|                          |             | Comercialización | 54 | 47 | 27  | 128 | 0,64  | 64   |
|                          |             | Importa          | 47 | 33 | 28  | 108 | 0,54  | 54   |
|                          |             | Exporta          | 31 | 15 | 11  | 57  | 0,285 | 28,5 |
|                          | Productos   | Farmacéuticos    | 90 | 57 | 38  | 185 | 0,925 | 92,5 |
|                          |             | Parafarmacia     | 52 | 27 | 16  | 95  | 0,475 | 47,5 |
|                          |             | Cosméticos       | 36 | 23 | 14  | 73  | 0,365 | 36,5 |
|                          |             | Veterinarios     | 28 | 13 | 11  | 52  | 0,26  | 26   |
|                          |             | Genéricos        | 7  | 2  | 9   | 18  | 0,09  | 9    |

Unidades: valores absolutos y porcentajes

De este modo España se ubica dentro del grupo de países *innovadores moderados*. Así calificado por la Union Scoreboard de la Unión Europea. Esta caracterización se percibe un sistema de innovación desequilibrado en investigación, de acuerdo con la evaluación efectuada de las ocho dimensiones que constituyen este organismo (Hollanders, & Es-Sadki, 2014).

- La inversión en I+D muestra la importancia estratégica competitiva de las empresas que se cuantifica en promedio anual. Sin embargo, resulta impreciso en este trabajo, al considerar que sólo el 10 % de la población analizada anunció sus cifras.

En este sentido, la industria farmacéutica mantiene una elevada tasa de inversión en I+D respecto a las ventas, lo cual caracteriza a esa industria a ser de las más intensivas en investigación científica y desarrollo tecnológico dedicando una quinta parte de toda la I+D industrial de Europa. Sin embargo, esta inversión es financiada casi en su totalidad con dinero privado.

Por su parte (Tsokanas y Fragouli, 2012) exponen que cada medicamento nuevo que entra en el mercado farmacéutico, es el resultado de un proceso de I+D largo, arriesgado y muy costoso (Badr, Madden & Wright, 2006).

- A finales del siglo XX, y acentuado a partir del año 2000, se observó una constante fusión entre empresas, que de acuerdo a los datos obtenidos el 26 % de la población, concluyó en un acuerdo comercial de fusión, adquisición o joint venture por convenir a sus intereses. Entre los motivos frecuentes, era lograr economías operativas, la extensión de productos, el crecimiento y sobre todo poseer ambas fortalezas. Este tipo de operaciones, busca posicionarse en nuevos mercados como el norteamericano, el asiático, australiano y africano a pesar de saber que en éste último, los recursos son escasos.

De este modo, la forma en que afectan estas operaciones reside en aumentar el número de firmas extranjeras establecidas en territorio nacional cuando se aspira posiblemente al crecimiento de firmas Españolas para desarrollo tanto del sector como del país. Así mismo, las fusiones no se considera como una constante entre firmas españolas.

En suma, el 60 % de las farmacéuticas produce fármacos para el grupo terapéutico Cardiovascular con el 31 %, seguido de Antineoplásicos (tumores) 27,5 % y del Sistema Respiratorio 11,57 %, reconocidos hasta el 2012 de acuerdo con el INE, 2010).

El grado de diversificación es aplicado a distintos grupos terapéuticos en los cuales han incursionado las

farmacéuticas de España. En tal caso se pueden identificar áreas de especialización al igual que las olvidadas y menos rentables. Las áreas terapéuticas con mayor presencia en las farmacéuticas atañen al sistema nervioso central (SNC), cardiovascular, digestivo-metabóli-

**Tabla 7.** Variables politómicas con sus atributos y características.

|  | Número de empresas     |         |     |
|--|------------------------|---------|-----|
|  |                        |         |     |
| Año fundación (variable discreta)          | S. XIX                 |         | 16  |
|  | S. XX                  |         | 156 |
|  | S. XXI                 |         | 22  |
|  | Sin datos              |         | 6   |
| Venta en millones de € (variable continua) | ≤ 2 mill de €          | Micro   | 33  |
|  | >20 y ≤ a 20 mill de € | Pequeña | 70  |
|  | >20 y ≤ a 66 mill de € | Mediana | 42  |
|  | ≥66 mill de €          | Grande  | 50  |
|  | Sin datos              |         | 5   |
| Internacionalización                       | Nacional               |         | 138 |
|  | América                |         | 94  |
|  | Europa                 |         | 129 |
|  | África                 |         | 60  |
|  | Asia                   |         | 87  |
|  | Australia              |         | 53  |
|  | USA                    |         | 74  |

**Tabla 8.** Variables dicotómicas con sus atributos y características.

|                       |   | Σ      | 200 | Fr  | %    |
|-----------------------|---|--------|-----|-----|------|
| Variables dicotómicas | Estructura de propiedad (pertenecer a un grupo empresarial) | Sí     | 50  | 0,3 | 25   |
|                       |   | No     | 150 | 0,8 | 75   |
|                       | Página web  | Sí     | 175 | 0,9 | 87,5 |
|                       |   | No     | 18  | 0,1 | 9    |
|                       |   | Vacías | 7   | 0   | 3,5  |
|                       | Se ha fusionado la empresa                                  | Sí     | 52  | 0,3 | 26   |
|                       |   | No     | 148 | 0,7 | 74   |
|                       | Han patentado (2008-2011)                                   | Sí     | 61  | 0,3 | 30,5 |
|                       |   | No     | 139 | 0,7 | 69,5 |
|                       | Realizan I+D+i  | Sí     | 126 | 0,6 | 63   |
|                       |   | No     | 74  | 0,4 | 37   |

co y respiratorio, lo cual supone el 67 % del mercado total en unidades vendidas (Farmaindustria, 2012).

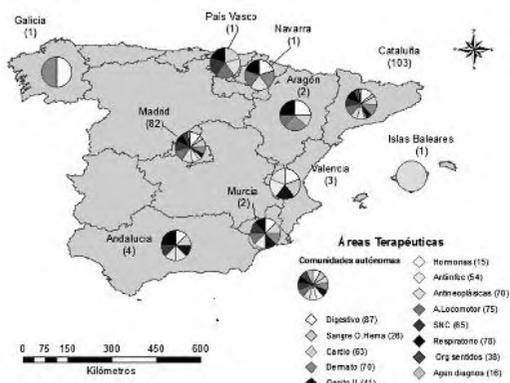
Desde la perspectiva geográfica, la figura 8 destaca las terapias representativas dadas la presencia en las



**Figura 8.** Áreas terapéuticas con mayor y menor presencia de producción, distribución o venta en las empresas farmacéuticas de España.

farmacéuticas. Por ejemplo, las firmas localizadas en Madrid o Cataluña, comprenden toda la gama de terapias analizadas. Sin embargo, no significa que cada empresa fabrique fármacos para todas las terapias expuestas, sino que su producción, distribución o venta para esas terapias se producen en laboratorios que se localizan físicamente en las comunidades señaladas y en diferentes magnitudes (ver figura 9).

Nota: El número dentro del paréntesis incluye el total de empresas en esa comunidad, y el número dentro del cuadro de contenido indica la cantidad de empresas que producen fármacos para esa terapia.



**Figura 9.** Distribución geográfica de firmas farmacéuticas que trabaja distintas áreas terapéuticas por comunidades autónomas. Fuente: Elaboración propia.

Con base en los resultados obtenidos, se enfatiza que la Federación Internacional de la Industria del Medicamento, ha constatado que las principales enfermedades crónicas son: cardiovascular, cáncer, enfermedades respiratorias y diabetes porque matan cada año a tres de cada cinco personas en el mundo con un 80 % de fallecimientos relacionados a países de ingresos medios y bajos (IFPMA, 2013).

Varios, como última sección, se refiere al ámbito de operaciones de venta de las farmacéuticas. La tabla 7

indica las zonas geográficas estimadas para la ubicación de mayor impacto, también nombrado *Grado de internacionalización* debido a la presencia de los productos farmacéuticos en diferentes países del mundo.

- Otra característica de la industria farmacéutica es el elevado grado de internacionalización con el que cuenta. Las instalaciones productivas propiedad de las compañías no se localizan exclusivamente en sus países de origen, sino que se han extendido al extranjero. Este proceso se ha protagonizado fundamentalmente por las empresas multinacionales farmacéuticas que comercian por el mundo. Aunque las razones que llevan a las compañías farmacéuticas a globalizar sus actividades pueden ser diversas y de dos tipos de motivos: por un lado, las que pretenden establecer su presencia comercial en el mayor número de mercados extranjeros, en un intento por resarcirse de los costes de la producción de fármacos. Por otro, las farmacéuticas buscan siempre obtener los recursos que necesitan, llevando sus servicios clave (I+D, producción de sustancias activas, dosificación y envasado, comercialización y venta) a escala mundial.

La internacionalización evoca el número de empresas que están presentes en cada zona geográfica analizada, a la cual se incluyeron los cinco continentes y dos zonas adicionales EE.UU. y España. El resultado muestra que España, Europa y el continente americano son los mercados que integran en cartera una mayor presencia de fármacos elaborados por las distintas farmacéuticas. Mientras que la adición de EE.UU., África, Asia y Austria, resulta ser menor.

## Conclusiones

Desde la perspectiva que proyecta el campo de la innovación a través de la literatura e información pública de las empresas farmacéuticas, se recuperaron datos relevantes del sector industrial español. En este sentido, es posible asumir que a nivel industrial el género *Farmacia* se ubica dentro de la gama de industrias innovadoras del país, a pesar de no pertenecer a los sectores más destacados como el automotriz o el aeronáutico (Farmaindustria, 2012). Sin embargo, gozan así mismo de buena posición en la categoría de principales sectores inversores para la innovación e I+D.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- La industria farmacéutica nacional está revelando una disminución del número de empresas asociadas y, un incremento de empresas extranjero a través de la creación de filiales. De acuerdo a la tendencia observada, se ha expuesto que ésta asume el crecimiento de grandes firmas internacionales y la disminución de micro empresas y Pymes nacionales de modo progresivo.

- Los polos de la innovación se identifican según las circunstancias geográficas en la comunidad de Madrid y Cataluña (Barcelona).
- El año de fundación de las empresas oscila entre 1812 y 2009, y la mayoría de los casos tienen una antigüedad de entre 21 y 50 años. Es decir que fueron fundadas entre los años de 1943-1973. Estos datos no ofrecen información de valor para emitir un discernimiento cualitativo sobre el perfil innovador sobre todo al no existir relación además, de no ser una variable dependiente de la innovación. Sin embargo es una referencia que se puede aplicar en futuros estudios.
- El 25 % de las empresas nacionales dedican esfuerzos a realizar tareas de I+D y señalan un bajo índice de innovación que pueda representar el sector farmacéutico dentro del esquema de industria innovadora.
- La industria farmacéutica española está integrada por micro empresas, pequeñas y medianas. Las grandes farmacéuticas establecidas en territorio español suelen atribuirse a firmas extranjeras. Entre las más reconocidas se encuentran las de origen norteamericano, francés, alemán, italiano y suizo (Farmaindustria 2015). Por lo que, sigue implícita la tendencia de que medianas y grandes empresas adquieran a las más pequeñas creando fusiones. Entre las ventajas observadas, se razona que pudiera evitar el desahucio de una empresa fortaleciéndose de dicha unión.
- Las farmacéuticas, siguiendo códigos de confidencialidad en la información, no siempre exteriorizan datos públicos, pero ofrecen opciones para obtener datos a través de portales privados de pago. Situación que es accesible para los más involucrados clasificándose en una posición elitista para personas y organizaciones seleccionadas.
- La fabricación de fármacos ha sido la principal actividad en las farmacéuticas nacionales y del resto del mundo. Mientras que para las de origen europeo, es la comercialización. Por otra parte, el tipo de productos relevantes siguen siendo los farmacéuticos. No obstante, la inclinación por productos de *Parafarmacia*, *cosméticos* y genéricos, se está robusteciendo paulatinamente, de modo que ya se pueden encontrar establecimientos exclusivos en el caso de Parafarmacia.
- Las empresas que cotizan en Bolsa, cumplen los requisitos que la Comisión Nacional de Mercado de Valores requiere para distribuir entre el público sus acciones, lo que aumenta el prestigio de la empresa al verse obligada a compartir información sobre su estado. El propósito es dar confianza a posibles inversores. Uno de los requisitos restrictivos es incluir

un capital mínimo de 1,2 millones de euros y ningún socio puede tener más del 25 % de las acciones. Lo anterior simboliza ser una empresa solvente a la hora de hacer negocios además de ser reconocida por proveedores, inversores y clientes (Comisión Nacional de Mercado de Valores, 2014; Sánchez y Borrel, 1996).

Conforme al tipo de innovación (producto y proceso) (OECD y Eurostat, 2005), se asume que el principal distintivo del sector farmacéutico, ha sido la innovación de producto en áreas terapéuticas ya existentes. Esto de acuerdo al número de dianas autorizadas por la Food & Drug Administration (FDA) anualmente. Lo que implica a las pymes creadoras de pequeños cambios. Por ejemplo: una nueva presentación del producto o la modificación limitada a los productos vigentes.

Así pues, las innovaciones radicales van dirigidas a las grandes firmas que poseen la capacidad de invertir recursos en I+D por ejemplo. En esencia, estas empresas suelen ser extranjeras. Por tanto, las farmacéuticas españolas no se preocupan en innovaciones radicales. Sin embargo, y dada la naturaleza de esta industria, las pymes son las que realizan pequeñas innovaciones a los fármacos de forma constante, y a su vez son el motor principal de la innovación farmacéutica española. Aunque, posteriormente deban acudir a firmas de mayor infraestructura para complementar desarrollo farmacéutico.

En las asociaciones de Farmaindustria y asociados al Plan Profarma, las empresas van cambiando según el plan al que pertenezca. Así, cada año la cantidad de empresas asociadas puede mostrar una ligera modificación, de forma que proponga un crecimiento o todo lo contrario.

Los resultados aquí mostrados son parte de un estudio realizado al sector farmacéutico español. Así pues, el comportamiento innovador observado y desde otra perspectiva menos común al presentar información concerniente a terapias, productos, servicios, y más, se logró alcanzar detalles que no se muestran en reportes anuales como la descripción de los polos de la innovación, ubicación geográfica por comunidad autónoma, países inversores, terapias y participación de I+D, entre otros.

Un dilema encontrado, se presenta en la ausencia de un formato homogéneo que permita expresar el porcentaje de ventas, la facturación mundial y las cifras alcanzadas de forma anual, en millones de euros o dólares americanos. La diversidad radica en que la información puede ser un concentrado de toda la empresa corporativa, y no de forma individual.

La consecuencia de todo lo anterior alude a un trabajo sobre el mismo sector con objeto de comprar características y atributos en distintos años, sin ignorar las limitaciones que se presentan como la ausencia de información financiera, la restringida disponibilidad de

información pública o tener que acudir a portales de pago para obtener datos de interés, así como el limitado acercamiento a las firmas farmacéuticas para efectuar encuestas en papel, on line o en persona.

Finalmente las tendencias de innovación que pueden afectar al sector farmacéutico en general, las menciona The National Intelligence Council, entre las que cita el empoderamiento individual, la difusión de poder, la demografía, los recursos naturales y medio ambiente, la ciencia y tecnología, la economía mundial y futuros conflictos (Tenet, 2000).

Después del año 2009 con la caída de la actividad en Europa, la evolución económica ha sido irregular (Farmaindustria, 2014). La crisis económica ha mostrado que España necesita cambiar su modelo de crecimiento económico para garantizar el desarrollo sostenible en el siglo XXI. (Farmaindustria, 2009). Esto es una oportunidad para la industria misma.

## Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en México por el apoyo en el desarrollo de ésta investigación.

## Referencias bibliográficas

- Amgen. (2013). Biotecnología. *Profesionales médicos*. España. Disponible en: [http://www.amgen.es/doc3.php?op=profesionales\\_medicos2&ap=biotecnologia&sub=bio5](http://www.amgen.es/doc3.php?op=profesionales_medicos2&ap=biotecnologia&sub=bio5) [Último acceso: 12/Febrero/2013]
- Badr, A., Madden, E., y Wright, S. (2006). The Contribution of CI to the Strategic Decision Making Process: Empirical Study of the European Pharmaceutical Industry. *Journal of Competitive Intelligence and Management*, 3(4),15-35.
- CNMV. (2014). Comisión Nacional de Mercado de Valores [Último acceso: 04/01/2015] Disponible en: <https://www.cnmv.es>
- Hollanders, H., & Es-Sadki, N. (2014). *Innovation Union Scoreboard 2014*. The Enterprise & industry online magazine
- Farmaindustria. (2010). *Memoria anual 2009*. España.
- Farmaindustria. (2012). *Memoria anual 2011*. España
- Farmaindustria. (2015). "Farmaindustria." Lista de empresas farmacéuticas asociadas. Disponible en: <http://www.farmaindustria.es/web/asociados/> [Último acceso: 07/Enero/2015]
- Fernández, L. (2006). ¿Cómo Analizar Datos Cualitativos? *Butlletí La Recerca* Fichas para investigadores 1-13.
- Formichela, M. (2005). *La evolución del concepto de innovación y su relación con el desarrollo*. Tres Arroyos (Ed.) Enero. Monografía. Estación experimental Agropecuaria Integrada Barrow (Convenio MAAyP-INTA).
- García, M. (1995). Un modelo de análisis competitivo del sector farmacéutico. *Investigaciones Europeas de Dirección y Economía de la Empresa*, 1(3), 103-111.
- IFPMA. (2013). La industria de investigación farmacéutica y la federación internacional de sociedades de la cruz roja y de la media luna roja. Noticias *Lainformación*. Ginebra, Suiza, Disponible en: <http://www.ifpma.org/> [Último acceso: 19/Marzo/2013] .
- INE. (2010). Instituto Nacional de Estadística. *Defunciones segun la causa de muerte. Año 2008*. Notas de prensa. España.
- INE. (2013<sup>a</sup>). Instituto Nacional de Estadística. Investigación y Desarrollo Tecnológico. Encuesta sobre innovación en las empresas 1.1 Resultados por ramas de actividad económica 2009. Disponible en: <http://www.ine.es/> [Último acceso: 27/Julio/2013].
- INE. (2013b). Instituto Nacional de Estadística. Encuesta industrial de empresas. Número de empresas por sector de actividad.
- MITYC Profarma. (2009). *Profarma Fomento de la competitividad en la industria farmacéutica (2009-2012)*. España.
- MITYC Profarma. (2010). *Profarma Fomento de la competitividad en la industria farmacéutica*. España.
- OECD. 2002. Frascatti Manual *Proposed standard practice for surveys on research and experimental development*. Paris, Francia: Head of Publications service.
- OECD & Eurostat. (2005). *Manual de Oslo-Guía para la recogida e interpretación de datos sobre innovación*. (G. Tragsa, Ed.) (3a ed.).
- Ortíz, I. (2003). *Integración entre inteligencia competitiva y gestión del conocimiento: una aplicación en la industria farmacéutica*. Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Organització d'Empreses [Tesis doctoral].
- Piña, E. (2007). La industria farmacéutica española: Análisis mediante la perspectiva de grupos estratégicos 2000-2003. *Vision Gerencial*, 6(1).
- Portalfarma. (2012). Portalfarma organización farmaceutica colegial. *Salud pública parafarmacia*. España. Disponible en: <http://www.portalfarma.com/Ciudadanos/saludpublica/consejosdesalud/Paginas/parafarmacia.aspx> [Último acceso: 02/Mayo/2013].
- Sánchez, J., & Borrel, M. (1996). *Curso de bolsa y mercados financieros*. (Instituto Español de Analistas Financieros, Ed.) España.
- Sistema de análisis de balances ibéricos, 2012. SABI. Universidad de Cantabria. [Último acceso: 12/ Marzo/ 2011].
- Tait, K. (2001). Industria Farmacéutica. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Instituto Nacionl de Seguridad e Higiene en el trabajo OIT*. Industrias químicas-industria farmacéutica (vol. III).
- Tenet, G., 2000. *Global Trends 2015: A Dialogue about the Future with Nongovernment Experts*. National intelligence council. NIC 2000-02 United States.
- Tsokanas, N., & y Fragouli, E. (2012). Competitive Intelligence: Concept, Context and a Case of Its Application. *Science Journal of Business Management*, (2).
- Vallejo, P. (2011). Tamaño necesario de la muestra: ¿Cuántos sujetos necesitamos? *Estadística aplicada a las ciencias sociales*. Facultad de humanidades. Universidad Pontificia Comillas. Madrid, España.
- Zaintek, 2003. *Guía de vigilancia tecnológica: sistema de información estratégica en las pymes*. Diputación foral de Bizkaia. Bilbao, España.

# Cultivo de *Arthrospira platensis* (Spirulina) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales en el sur del Perú

## Cultivation of *Arthrospira platensis* (Spirulina) in curved doubly tubular photobioreactor to environmental conditions in the South of the Peru

Ronald Huarachi-Olivera\*, Úrsulo Yapó-Pari\*\*, Alex Dueñas-Gonza\*, José Condori-Huamanga\*\*, D.G. Pacheco-Salazar\*\*, Joe Soto-Flores\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50679

### Resumen

El presente trabajo investigó el cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* (Spirulina) en valores de productividad cultivado en fotobiorreactor tubular doblemente curvado a condiciones ambientales con el fin de aprovechar la alta radiación solar de la región Arequipa en el sur de Perú (16°24'50" LS; 71°32'02" LO; 2344 msnm). El fotobiorreactor fue construido con un tubo transparente de policloruro de vinilo (PVC). La productividad del cultivo fue de 13.9 g/m<sup>2</sup> en 14 días ó 1 g/m<sup>2</sup>/día y una concentración de clorofila - "a" de 0.00785 mg/L con una máxima radiación de 1179 W/m<sup>2</sup>, y una iluminación de 121500 lux, convirtiendo sus filamentos helicoidales a morfologías anormales, tales como formas irregulares curvas e incluso lineales con fragmentaciones, demostrando que el cultivo se vio afectado por la alta radiación y las variaciones de temperaturas de Arequipa.

**Palabras clave:** cultivo, fotobiorreactor, productividad, sur de Perú, Spirulina.

### Abstract

The present work investigated the cultivation of microalgae *Arthrospira platensis* (Spirulina) in productivity values cultivated in doubly curved tubular photobioreactor to environmental conditions in order to take advantage of the high solar radiation of the Arequipa region in southern Peru (16°24'50" LS; 71°32'02" LW; 2344 msnm.). The photobioreactor was built with a transparent tube of polyvinyl chloride (PVC). The productivity of the crop was 13.9 g/m<sup>2</sup> in 14 days or 1 g/m<sup>2</sup>/day and a concentration of chlorophyll - "a" 0.00785 mg/L with a maximum radiation of 1179 W/m<sup>2</sup>, and a 121500 lux illumination, making its helical filaments abnormal morphologies, such as curves and linear even irregular shapes with fragmentation, demonstrating that the crop was affected by high radiation and variations in temperatures of Arequipa.

**Key words:** culture, photobioreactor, productivity, South of Peru, Spirulina.

**Recibido:** enero 22 de 2015

**Aprobado:** abril 22 de 2015

### Introducción

La disponibilidad de luz y un régimen de luz/oscuridad se consideran dos de los factores más importantes que limitan la productividad de la biomasa de las microal-

gas bajo condiciones ambientales (Richmond, 1990). El flujo turbulento en el cultivo representa un medio práctico para mejorar la distribución de la energía solar. Cuando la turbulencia es insuficiente se convierte

\* Laboratorio de Biología Acuática, Departamento Académico de Biología, Av. Alcides Carrión s/n, e-mail: biologiaacuaticaunsa@gmail.com; rhuarachi@unsa.edu.pe

\*\* Departamento Académico de Física, Av. Independencia s/n

\*\*\* Centro de Microscopía Electrónica, Av. Independencia s/n. Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), Arequipa, Perú.

en el patrón de flujo laminar, resultando en una disminución de la eficacia de la utilización solar. La turbulencia también aumenta las tasas de intercambio de nutrientes y metabolitos entre las células y su medio de crecimiento (Grobbehaar, 1994). Se ha demostrado que aumentando el flujo turbulento en los cultivos de *Spirulina* en estanques, se incrementa la productividad, así como la densidad óptima (Richmond y Vonshak 1978; Vonshak *et al.*, 1982).

La elección de un diseño óptimo de fotobiorreactor para el cultivo masivo de microalgas es un factor importante que rige la productividad general fotosintética. Hasta la fecha, casi toda la producción comercial de esta alga se realiza en estanques en la que el cultivo es agitado con una rueda de paletas. Los fotobiorreactores cerrados proporcionan muchas ventajas como mayor disponibilidad de luz (alta relación superficie/volumen), control de temperatura, alta concentración de biomasa, disminución de costos en la cosecha, baja tasa de contaminación, y facilidad de automatizar el proceso con el fin de lograr una mejor utilización de la energía solar y temperatura en todo momento. Por lo tanto, el propósito del diseño y desarrollo de los fotobiorreactores a condiciones ambientales es aprovechar la luz solar, disminuir costos y lograr la máxima producción de algas. En las regiones relativamente cálidas, donde se produce la mayor parte de la biomasa algal, se ha supuesto que el principal factor limitante para el crecimiento es la luz. Muchos estudios han tratado de aumentar la luz disponible para las células de las algas cultivadas a condiciones ambientales; mientras que Richmond y Vonshak, (1978) demostraron un aumento en la productividad de los cultivos a condiciones ambientales de *A. platensis* al incrementar el flujo turbulento. Esta observación fue confirmada por estudios posteriores (Laws *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1991; Grobbehaar, 1994; Sukenik *et al.*, 2009). La explicación de este fenómeno se sigue debatiendo. Algunas de las explicaciones han atribuido el resultado a la mejora de la transferencia de masa de nutrientes, al efecto de luz parpadeante (Kok, 1956), y la eliminación del exceso de oxígeno (Torzillo *et al.*, 1998). Sin embargo, el aumento del flujo turbulento en cultivos de algas al aire libre es generalmente aceptado para mejorar el ciclo de luz/oscuridad y el mejoramiento de la eficiencia fotosintética de los cultivos (Richmond, 2004). La producción en masa de *Arthrospira* en estanques tiene una producción anual estimada de 8000 toneladas métricas. Un mayor desarrollo de esta industria es dependiente de la capacidad de reducir los costos de producción con el fin de permitir la comercialización de *Arthrospira*. Una forma de lograr este objetivo es mediante el aumento de la productividad de los cultivos a condiciones ambientales mediante la superación de los factores ambientales limitantes como la temperatura y luz. Los cultivos de algas a condiciones ambientales están expuestos a fluctuaciones diurnas de la luz que pueden limitar no sólo la luz, sino

también causar fotoinhibición del cultivo durante una parte significativa del día (Vonshak y Guy, 1992; Lu y Vonshak, 1999). Aunque la radiación solar se da a condiciones ambientales, uno puede modificar la luz disponible para células de las algas cultivadas utilizando diferentes métodos.

En el Perú, la región desértica de Arequipa presenta una gran luminosidad solar caracterizada por el cielo despejado y ausencia de lluvia durante todo el año, además de presentar altas temperaturas diurnas siendo adecuados para la producción de biomasa. Sin embargo, las mejoras en el diseño de un fotobiorreactor podría capturar casi toda la luz solar disponible, siendo el objetivo del presente trabajo evaluar la productividad de *Arthrospira platensis* empleados en el cultivo masivo en fotobiorreactor tubular doblemente curvado bajo condiciones ambientales observando los cambios morfológicos en los filamentos de *A. platensis*.

## Materiales y métodos

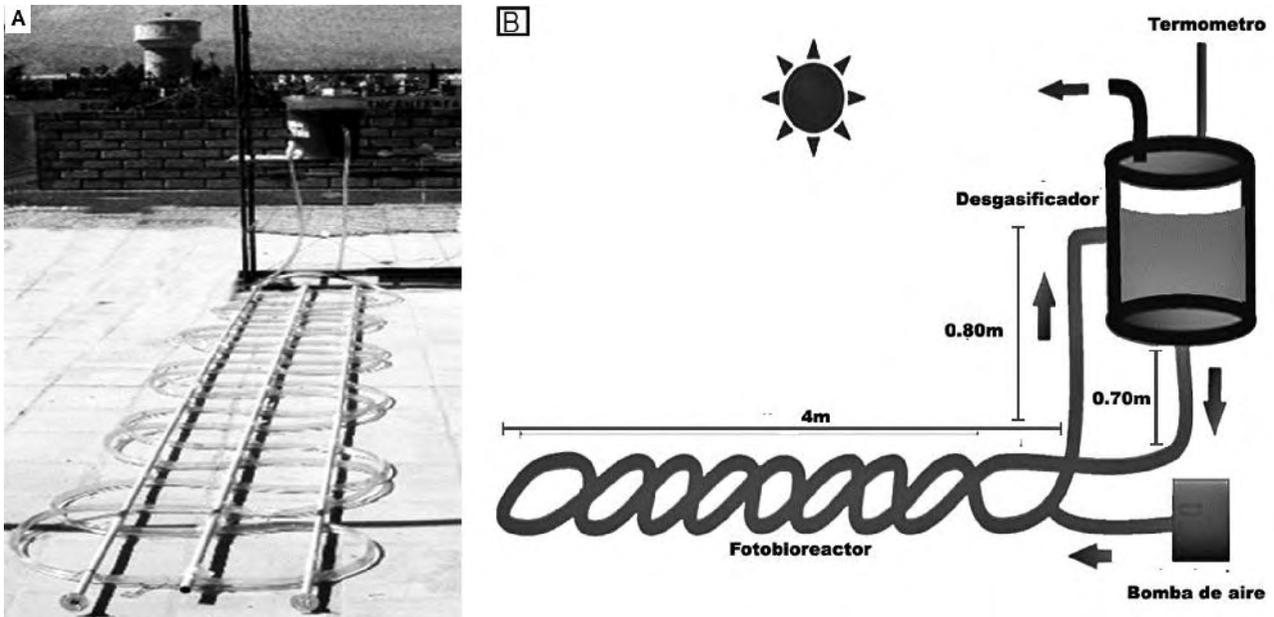
### Organismo y condiciones del cultivo

El inóculo de *A. platensis* fue obtenido de la Colección de Biotecnología de microalgas del Laboratorio de Biología Acuática-UNSA, Arequipa, Perú. El cultivo fue mantenido usando la solución hidropónica "La Molina" al 25% (Rodríguez-Delfín *et al.*, 2001), con la siguiente composición (g/L): Solución A; Superfosfato triple 35; KNO<sub>3</sub> 110; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 70; Solución B; MgSO<sub>4</sub> 44; Fertilón combi 2.5; Ácido bórico 0.24 y NaHCO<sub>3</sub> 8g (Marca Merck).

Todos los nutrientes fueron disueltos en agua deionada y ajustados a pH= 9 y esterilizados a 120 °C y 15 Lb de presión durante 20 min. El volumen del cultivo de *A. platensis* en fotobiorreactor fue de 5,73 L manteniendo el rango de pH entre 9-10 y con una temperatura máxima de 22.6 °C y temperatura mínima de 9.4°C. El cultivo al aire libre en fotobiorreactor se localizó a 16°24'50'' de Latitud sur, 71°32'02'' de Longitud oeste, altitud de 2344 msnm.

### Diseño y operación del sistema

El sistema utilizado en este estudio consistió de tres partes: (1) Fotobiorreactor doblemente curvado de 4m de largo, construido con un tubo transparente de policloruro de vinilo (PVC) de 15.3 m de longitud y 12 mm de diámetro interno; 2) Desgasificador de 4 L de capacidad; 3) Bomba de aire, modelo ACQ-001; Electromagnetic Air Compress, de la empresa BOYU (figura 1) (Carlozzi y Torzillo, 1995) El fotobiorreactor fue cubierto con una lámina de plástico anti-UV y malla Rachel de 50%, para evitar la excesiva radiación UV ocasionada por la exposición directa a la luz solar. Para el mezclado y aireación de la microalga se utilizó una bomba de aire. El tubo de PVC que forma el fotobiorreactor ocupó una superficie de 0.577 m<sup>2</sup>; este

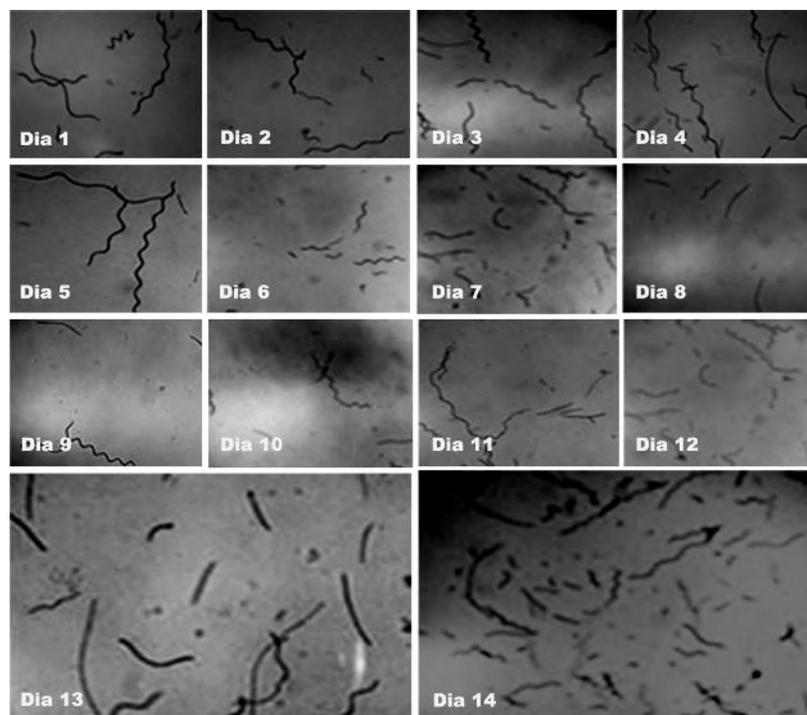


**Figura 1.** Fotobiorreactor diseñado para el cultivo de *Arthrospira platensis* (Spirulina) bajo condiciones ambientales. A. Vista externa del fotobiorreactor tubular doblemente curvado. B. Esquema general del fotobiorreactor tubular doblemente curvado.

valor se usó para calcular la producción de biomasa por metro cuadrado. El volumen total del tubo que forma el fotobiorreactor fue de 1.73 L = ( $\pi \times (0.006 \text{ m})^2 \times 15.3 \text{ m}$ ). La proporción entre el volumen y el área de la superficie iluminada (tubo de PVC) del fotobiorreactor fue de 0.33 m<sup>2</sup>/L. El volumen total del sistema

fue de 5.73 L que resulta de sumar los volúmenes del fotobiorreactor y el degasificador.

#### *Radiación solar y condiciones experimentales*



**Figura 2.** Estructuras espirales de *Arthrospira platensis* a diferentes tiempos (días).

La radiación solar se midió con un radiómetro UV solar marca Davis, modelo 06490 y la iluminancia se midió con medidor digital de luz, marca Extech, Modelo 401025 medidos por la estación meteorológica de la Escuela Profesional de Física de la UNSA, Arequipa, Perú. El experimento se llevó a cabo desde el 18 de octubre al 1 de noviembre de 2013.

### Observación morfológica de los filamentos de *Arthrospira platensis*

Los cambios morfológicos de filamentos de *A. platensis* fueron examinados usando un microscopio óptico (Labor-Tech, MODEL: 2001, Germany). Las imágenes digitales se registraron con una cámara digital, observando diariamente la morfología de los filamentos (figura 2).

Para la comparación de la estructura ultramicroscópica de los filamentos de *A. platensis*, se utilizó el mi-

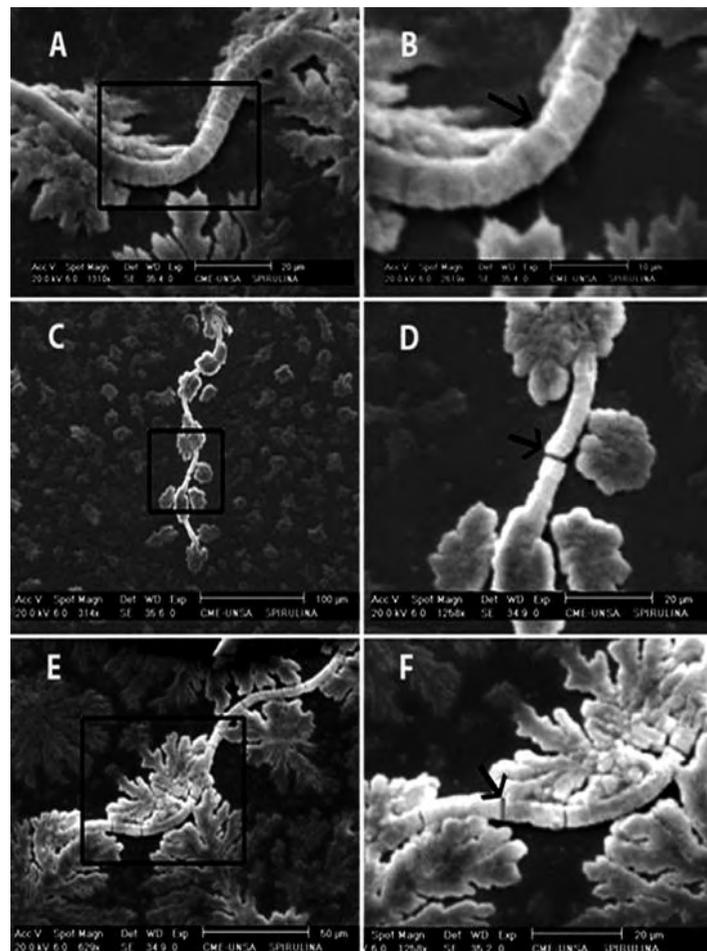
croscopio electrónico de barrido marca Philips SEM XL 20 con microanalizador de rayos X por dispersión de energía marca EDAX DX 4i. Las muestras fueron recubiertas con una capa metálica de oro de espesor aproximado de 100 Å con el metalizador de vacío marca Denton Vacuum Desk II. (figura 3).

### Crecimiento de *A. platensis*

El crecimiento de *A. platensis* se desarrolló en fotobiorreactor tubular doblemente curvado con 5.73 L de cultivo con una concentración inicial de  $48 \times 10^3$  org/ml. Los filamentos fueron contados en cámara de Sedgwick-Rafter (Moheimani *et al.*, 2013).

### Determinación de la biomasa

Para determinar en contenido de clorofila "a" las muestras de *A. platensis* se concentraron mediante



**Figura 3.** Comparación de la estructura microscópica de *Arthrospira platensis* donde se muestra la variación morfológica de los filamentos. (A, B) Vista de un filamento normal. (C, D, E, F) Vista de filamentos fragmentados. Los tricomas de los filamentos fragmentados están indicados con flechas. (Fotos tomadas por J. Soto. Centro de Microscopía Electrónica (CME), Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), Arequipa – Perú).

centrifugación a 10000 rpm x 10 min, y fueron lisadas con nitrógeno líquido. La densidad óptica se midió por el método espectrofotométrico a 750 nm y 664 nm (APHA, 1992). La determinación de la biomasa seca se realizó en estufa durante 2 h a 105 °C (Vonshak, 2002).

## Resultados y discusión

### Radiación solar y condiciones experimentales

Se obtuvo una radiación solar media igual a 953.6 W/m<sup>2</sup> siendo la máxima radiación alcanzada después del día 10 con 1179 W/m<sup>2</sup>, con un límite superior igual a 1143 W/m<sup>2</sup> el límite inferior igual a 764.01 W/m<sup>2</sup> (figura 4). Por la situación geográfica de la región Arequipa, los días tienen alta radiación solar, con temperaturas variables y bajas durante la noche en la mayor parte del año. Las medidas realizadas de la iluminación al aire libre, fueron de 121500 lux.

*A. platensis* en fotobiorreactor tubular doblemente curvado tuvo una velocidad promedio del medio de cul-

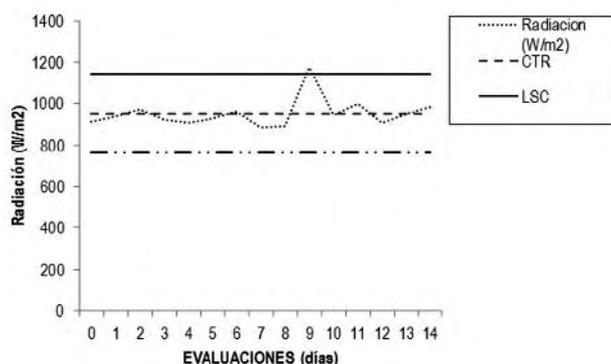


Figura 4. Radiación solar máxima tomada desde el 18 de octubre al 1 de noviembre de 2013. (Fuente: Estación Meteorológica de la Escuela Profesional de Física (EPF) de la UNSA)

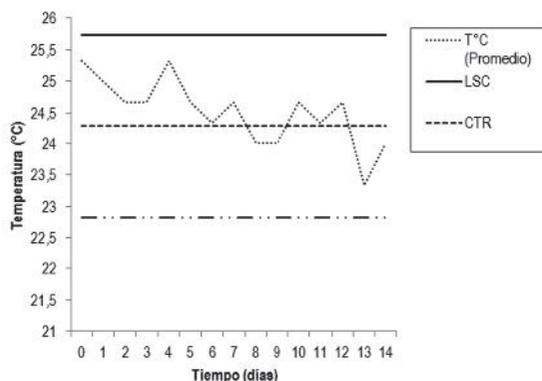


Figura 5. Relación entre la temperatura media de la producción de *Arthrospira platensis* en fotobiorreactor doblemente curvado y el tiempo de evaluación (en días). LSC = Límite Superior de Confianza; LIC = Límite Inferior de confianza; CTR = Valor medio de la Temperatura.

tivo de 0.3 m/s con un caudal promedio igual a 0.034 L/s. El caudal de la bomba de aire sin medio de cultivo fue de 0.0833 L/s. La prueba de comparación de ANOVA muestra el estadístico de Fisher ( $F = 330.926$ ); con diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ), en los 4 puntos de evaluación de temperatura: 1) en el cultivo en fotobiorreactor; 2) en ambiente externo; 3) dentro del sistema y 4) medidas realizadas en la Estación Meteorológica de la Escuela Profesional de Física (EPF) de la UNSA (tabla 1). La temperatura de evaluación alcanzada fue de 25.74°C como límite superior y la temperatura media fue de 24.28°C hasta los 14 días de evaluación y 22.82 °C como límite inferior al 95% de confianza (figura 5). La prueba de Tukey muestra un mayor registro en la T° (cultivo) con  $24.27 \pm 0.66$

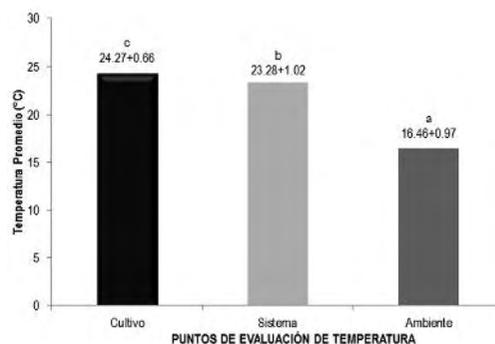


Figura 6. Prueba de comparación múltiple de Tukey para los puntos de evaluación de temperatura en fotobiorreactor tubular doblemente curvado.

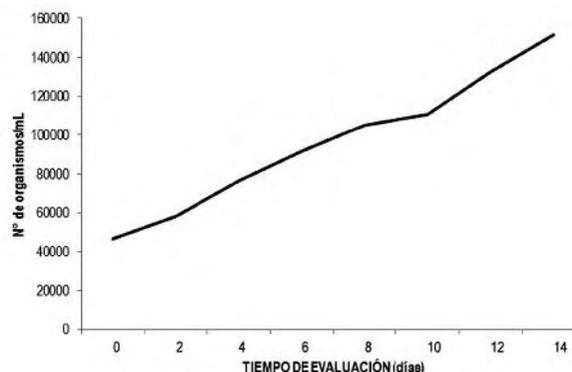


Figura 7. Crecimiento de *A. platensis* en fotobiorreactor tubular doblemente curvado hasta los 14 días de evaluación

°C; mientras que el menor registro se presentó en la T° (al aire libre) (Estación meteorológica EPF) con  $16.46 \pm 0.97$ °C (figura 6).

### Cambios morfológicos de *Arthrospira platensis*

Los filamentos de *A. platensis* cultivados en fotobiorreactor, en los primeros 5 días de cultivo mantuvieron su forma característica en espiral (hasta de 13 espiras) con aparición de las primeras fragmentaciones en los

**Tabla 1:** Comparación de temperaturas en diferentes puntos de evaluación.

| Fuente de variabilidad | Suma de cuadrados | g.l. | Media cuadrática | F       | Sig. |
|------------------------|-------------------|------|------------------|---------|------|
| -Temperatura           | 542,172           | 2    | 271,086          | 330,926 | 0,00 |
| -Error                 | 34,4              | 42   | 0,819            |         |      |
| -Total                 | 576,578           | 44   |                  |         |      |

filamentos. En el día 6, se observó un aumento en el número de fragmentaciones, en el día 7 se observaron filamentos muy alargados con escasa formación de espiras (figuras 2 y 3C), en los días 8 al 14 aumentó la proporción de filamentos fragmentados.

Las roturas de los filamentos de la estructura espiral de *A. platensis* fue estudiado por Wu *et al.*, (2005) donde menciona que las roturas se ve alterado por las temperaturas bajas y no por los niveles naturales de radiación ultravioleta (UV). Además muchas cianobacterias son capaces de sintetizar compuestos absorbentes de UV en respuesta a la excesiva radiación, tales como micosporinas, aminoácidos y escitomenina, que protegen a modo de pantalla las células antes que la radiación UV alcance los componentes intracelulares (García y Castenholz, 1993). Por la tanto en este estudio la rotura de los filamentos podría deberse a temperaturas bajas de la zona durante la noche y al amanecer (15 - 18 °C) por lo que se sugiere que estos cambios morfológicos están acoplados a procesos fisiológicos y moleculares a bajas temperaturas y no en respuesta a la excesiva radiación UV. En estudios por Vonshak *et al.*, (1994) y Vonshak, (1997) se encontró que la baja temperatura de la mañana junto con la alta intensidad de la luz podría inducir estrés fotoinhibitorio de *A. platensis* y que aumentando la temperatura del cultivo hasta 35 °C puede revertir la inhibición y aumentar casi cuatro veces más la producción diaria.

Durante todo el cultivo de la investigación se observó que la longitud de los filamentos espirales de *A. platensis* son de mayor tamaño y de color verde más claro que las cultivadas bajo condiciones de laboratorio. Una posible causa de la mayor longitud de los filamentos espirales de *A. platensis* podría ser su configuración espiral debido a que los filamentos adoptan una estructura helicoidal más apretada con espiras pequeñas permitiendo alcanzar mayor longitud. Las cepas de *A. platensis* de estructura helicoidal más apretada pueden tolerar mayor intensidad de luz en comparación con aquellas cepas con espirales más flexibles (Jeeji y Seshadri, 1980). Además espirales sueltas podrían transformarse a las formas en espiral más apretada cuando se cambia a condiciones de luz intensa (Fox, 1996; Wu *et al.*, 2005), trabajando con dos cepas diferentes de *A. platensis*, sugirió que la

transición de espiras sueltas a muy apretadas en presencia de radiación UV-B podría ser un mecanismo de protección eficaz. Este cambio morfológico de auto-sombreado de *A. platensis* debido a las espirales más apretadas parecen estar asociadas con la estrategia de protección de este organismo para contrarrestar la radiación (UV) solar. Es bien sabido que la radiación UV induce daños, tales como el blanqueo de los pigmentos, la degradación de proteínas e inactividad enzimática, en muchos organismos. Sin embargo, algunos organismos han desarrollado estrategias de reparación en contra de ella, tales como la síntesis de novo de proteína (por ejemplo de proteína D1 y D2) (Sass *et al.*, 1997), la reparación del ADN (Britt, 1995; Häder y Sinha, 2005) y la eliminación de radicales de oxígeno (Mittler y Tel-Or 1991; Middleton y Teramura 1993).

En el estudio de la estructura ultramicroscópica de los filamentos de *A. platensis* mediante microscopía electrónica a diferentes escalas (20; 100 y 50  $\mu\text{m}$ ) se observa los filamentos de *A. platensis* donde se observa la disminución del número de espiras en el filamento (figura 3C y 3D) con una fragmentación, y filamentos con varios puntos por fragmentarse señalado con flechas (figura 3E y 3F).

### Productividad de biomasa

La concentración de clorofila "a" en valores de biomasa en fotobiorreactor doblemente curvado fue de 0.00785 mg/L, con una iluminancia de 121500 lux. La composición de clorofila "a" presente en *Spirulina* varía de 0.8 a 1.5 % de materia seca (Paoletti *et al.*, 1980). De acuerdo al conteo de filamentos de *A. platensis* el máximo crecimiento se obtuvo a los 14 días con 151667 org/mL cuyo crecimiento se ajusta al modelo "lineal" ( $Y=a + bX$ ) en fotobiorreactor tubular doblemente curvado ( $R^2=0.990$ ;  $F=593.060$ ) (figura 7) (Guisande *et al.*, 2013).

Se obtuvo una concentración de biomasa de (1.4 g/L) al final de los 14 días con un sistema de 5.73 L, una producción total de 8.022 g obteniendo una productividad de 13.9 g/m<sup>2</sup> ó 1 g/m<sup>2</sup>/día en 14 días a 121500 lux en el fotobiorreactor tubular doblemente curvado. Se realizaron muchas investigaciones en *A. platensis* cultivadas en fotobiorreactores tubulares en condicio-

nes ambientales por Vonshak *et al.*, (1996) donde obtuvo concentraciones entre 2 a 2.225 g/L de biomasa seca en 24 horas con una irradiación solar total de 254.6 W/m<sup>2</sup>. Andrade y Costa, (2008) realizaron cultivos de *Spirulina platensis* al aire libre en el extremo sur de Brasil obteniendo 1.94 g/L con una productividad máxima de 0.059 g/L/día. Otros autores como Zittelli *et al.*, (1996) obtuvieron productividades promedio de 0.83; 0.44 y 0.61 g peso seco L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> alcanzados en otoño (septiembre-octubre), invierno (noviembre-diciembre) y marzo, respectivamente.

Los resultados presentan la productividad alcanzada bajo condiciones ambientales de la región Arequipa, caracterizada por la alta radiación solar y temperaturas muy variables de 22.6 °C a 9.4 °C menor a los obtenidos por Vonshak *et al.*, (1996) y Zittelli *et al.*, (1996). Esta baja producción en la biomasa podría deberse a un efecto de fotoinhibición debido a la alta radiación de la región. Aunque la fotoinhibición ha sido estudiada intensamente en los últimos diez años (Baker y Bowyer, 1994; Kyle *et al.*, 1987) muy poco se ha estudiado el efecto de la productividad en los sistemas de cultivo de microalgas. El rol de la fotoinhibición como factor ecológico en sistemas acuáticos ha sido revisado por Neale, (1988) donde se concluye que la importancia de la fotoinhibición en sistemas acuáticos es emergente y es tomado como factor en la estimación de la productividad acuática. Estudios sobre la fotoinhibición en algas de interés comercial son muy limitadas siendo Vonshak *et al.*, (1988) los primeros en estudiar la fotoinhibición en *Spirulina* bajo condiciones de laboratorio seguido por un estudio posterior para estimar el efecto bajo condiciones externas.

Vonshak y Guy, (1992), cuantificaron el efecto de la fotoinhibición en la productividad, estimando que la pérdida de la producción potencial de cultivos en sistemas abiertos puede ser más del 25% debido a la fotoinhibición. Estudios adicionales de la interacción del estrés por luz y temperatura fue estudiado por Jensen y Knutsen, (1993) donde demostraron que la temperatura de cultivo por debajo del crecimiento óptimo de *Spirulina* es más sensible a la fotoinhibición. Además Vonshak *et al.*, (1994) demostró que la fotoinhibición en los fotobiorreactores tubulares bajo condiciones ambientales se puede prevenir aumentando la temperatura por encima de la temperatura óptima durante el día. Muchos trabajos se necesitan para estimar el efecto exacto en la productividad de cultivos bajo condiciones ambientales. Si consideramos la fotoinhibición como un proceso fisiológico que disminuye la producción de biomasa de *Spirulina*, la selección de cepas propias de cada región con capacidad de tolerar y mejorar significativamente la productividad de cultivos a condiciones ambientales es una buena alternativa.

## Conclusiones

Los resultados presentados indican que la fuerte radiación solar incidente sobre el sistema de cultivo en fotobiorreactor doblemente curvado, afecta la morfología y la productividad de *A. platensis*. Por lo tanto esta radiación solar no es óptima para el sistema de cultivo en fotobiorreactor al aire libre, evidenciada en una baja productividad de biomasa y contenido de clorofila de 13.9 g/m<sup>2</sup> y de 0.00785 mg/L respectivamente. Mientras que la temperatura alcanzada durante el día mostró ser adecuadas para el cultivo de *A. platensis*. Se requieren más estudios para conocer y establecer el porcentaje de radiación solar óptima para obtener una buena productividad de *A. platensis* en fotobiorreactores tubulares.

## Referencias bibliográficas

- Andrade, M. R.; y Costa, J. A. (2008). Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of biosciences*, 63(11), 85-90.
- APHA (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters. 18va.edición. *American Public Health Association*. Washington, DC.
- Baker, N., y Bowyer J.R. (1994). Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field. *Bios Scientific Publishers Ltd*, Oxford.
- Britt, A.B. (1995). Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology*, 108 (3), 891-896.
- Carlozzi, P., y Torzillo, G. (1995). Productivity of *Spirulina* in a strongly curved outdoor tubular photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 (1-2),18-23.
- Fontes, A.G., Vargas, M.A., Moreno, J., Guerrero, M.G., Losada, M. (1991). Changes in the pigment content of *Anabaena variabilis* cells in outdoor culture. *Journal of Plant Physiology*, 137(4), 441 - 445.
- Fox, R. (1996). *Spirulina*. Production and Potential. *Edisud*, En-Provence, France.
- García, F., y Castenholz, R. (1993). Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 163-169.
- Grobbelaar, J.U. (1994). Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations. *Journal of Applied Phycology*, 6(3),331-335.
- Guisande, C., Vaamonde, A., Barreiro A. (2013). Tratamiento de datos con R, Estadística y SPSS. 2ª Edición electrónica. *Ediciones Díaz de Santos*. Universidad de Vigo. Galicia-España. pp. 1-977.
- Häder, D.P.; y Sinha, R.P. (2005). Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research*. 571(1-2):221-233.
- Jeeji, B.N; y Seshadri, C.V. (1980). On coiling and uncoiling of trichomes in the genus *Spirulina*. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement*, 26, 32 - 47.
- Jensen, S.; y Knutsen, G. (1993). Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5(5), 495-504.
- Kok, B. (1956). Photosynthesis in flashing light. *Biochimica et Biophysica Acta*, 21(2), 245-258.
- Kyle, D. J., Osmond, C. B., y Arntzen, C.J. (1987). Photoinhibition Topics In photosynthesis, Vol. 9. Elsevier, Amsterdam.
- Laws, E.A., Taguchi, S., Hirata, J., Pang, L. (1988). Optimization of microalgae production in a shallow outdoor flume. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(2),140-147.
- Lu, C.M., y Vonshak, A. (1999). Characterization of PSII photochemistry in salt adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *New Phytologist*, 141(2), 231-239.

- Middleton, E.M. y Teramura, A.H. (1993). The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiology*, 103(3), 741-52.
- Mittler, R., y Tel-Or, E. (1991). Oxidative stress responses in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Free radical research communications*, 12-13(2), 845-850.
- Moheimani, N., Borowitzka, M., Isdepsky, A., Sing, F. (2013). Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. *Algae for Biofuels and Energy, Developments in Applied Phycology*, 5, 265-284.
- Neale, P. (1988). Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ (eds), Elsevier, Amsterdam, 39-66.
- Paoletti, C., Vicenzini, M., Bocci, F., Materassi, R. (1980). Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. (ed). *Prospettive della coltura di Spirulina in Italia*. Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche. pp. 111-125.
- Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. In: *Progress in Phycological Research* (eds F.E. Round & D.J. Chapman), pp. 269-330. *Bioprocess*, Bristol.
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia*, 512 (1-3), 33-37.
- Richmond, A., Vonshak, A. (1978). *Spirulina* Culture in Israel. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement*, 11, 274-280.
- Rodríguez-Delfín, A., Hoyos, M., Chang, M. (2001). Soluciones Nutritivas en Hidroponía: Formulación y Preparación. CIHNM, UNALM. Lima, Perú.
- Sass, L., Spetea, C., Máté, Z., Nagy, F., Vass, I. (1997). Repair of UV-B induced damage of Photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research*, 54(1), 55-62.
- Sukenik, A., Beardall, J., Krokamp, J.C., Kopecky, J., Masojídek, J., Van Bergeijk, S., Gabai, S., Shaham, E., Yamshon, A. (2009). Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, 56, 297-308.
- Torzillo, G., Bernardini, P., Masojídek, J. (1998). On - line monitorin of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on the productivity of outdoor cultures of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 34 (3), 504-510.
- Vonshak, A., Torzillo, G., Tomaselli, L. (1994). Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 6 (1), 31-34.
- Vonshak, A. (1997). Outdoor mass production of *Spirulina*: the basic concept. In Vonshak, A. [Ed.] *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology. Taylor & Francis Publishers, London, pp. 79-99.
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. Taylor & Francis. Ben Gurion University of the Negev, Israel. 227 p.
- Vonshak, A., Guy, R., Poplawsky, R., Ohad, I. (1988). Photoinhibition and its recovery in two strains of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant and Cell Physiology*, 29 (4), 721-726.
- Vonshak, A., y Guy, R. (1992). Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga, grown outdoors. *Plant, Cell & Environment*, 15 (5), 613-616.
- Vonshak, A., Torzillo, G., Accolla, P., Tomaselli, L. (1996). Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors. *Physiologia Plantarum*, 97(1), 175-179.
- Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Richmond, A. (1982). Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2,175-186.
- Wu, H., Gao, K., Villafañe, V.E., Watanabe, T., Helbling, E. (2005). Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5004-5013.
- Zittelli, G.C., Tomasello, V., Pinzani, E., Tredici, M.R. (1996). Outdoor cultivation of *Arthrospira platensis* during autumn and winter in temperate climates. *Journal of Applied Phycology*, 8(4-5), 293-301.

## Comité evaluador

La Revista Colombiana de Biotecnología ofrece sus agradecimientos a los siguientes docentes quienes actuaron en el presente número como Comité de Arbitraje:

Amador, Belkys T.; PhD., Grupo de Biomecánica; Universidad Simón Bolívar; Venezuela; bamador@unet.edu.ve.

Angulo-Cortés, Jimena Paola; PhD., Centro Avanzado de Gestión, Innovación y Tecnología para la Agricultura (CATA), Depto Industrias; Universidad Técnica Federico Santa María; Chile; jimena.angulo@usm.cl.

Aragón Caicedo, Oscar; MSc., cPhD Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; oaragonc@unal.edu.co.

Augusto Rhoden, Sandro; PhD., Biología das Interações Orgânicas; IFC- Instituto Federal Catarinense, Câmpus de São Francisco do Sul; Brasil; sandro\_ar@hotmail.com.

Benitez Campo, Neyla; PhD., MSc., Ciencias ambientales; Universidad del Valle; Colombia; neyla.benitez@correounivalle.edu.co.

Bernal, Mauricio; MSc., cPhD Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; jmbernalmo@unal.edu.co.

Bonilla Buitrago, Ruth Rebeca; PhD., Investigador principal, Laboratorio de Microbiología de Suelos; CORPOICA - Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria; Colombia; rbonilla@corpoica.org.co.

Borges García, Misterbino; PhD. Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias; Universidad de Granma; Cuba; mborgesg@udg.co.cu.

Borrás, Orlando; MSc., División de Plantas; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB; Cuba; orlando.borras@cigb.edu.cu.

Buitrago H., Gustavo; MSc., Profesor asociado, Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; gbuitragoh@unal.edu.co.

Bustamante R., Silvia L.; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; sbustamante@unal.edu.co.

Cárdenas Caro, Diana María; PhD., Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Básicas, Depto de Biología; Universidad Francisco de Paula Santander; Colombia; diana.cardenascarohotmail.com.

Comba González, Natalia Beatriz; MSc Microbiología, cPhD Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; natalia.comba@gmail.com.

Corredor, Gloria Amparo; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; gacorredorh@unal.edu.co.

Cueto, Clementina; PhD., Facultad de Ingeniería, Maestría en Diseño y Gestión de Procesos; Universidad de La Sabana; Colombia; maria.cueto@unisabana.edu.co.

Dalla Rizza, Marco; PhD., Unidad de Biotecnología; Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas); Uruguay; mdallarizza@inia.org.uy.

Del Rivero Bautista, Nydia; PhD., Profesor Investigador Asociado, Campus Tabasco; Colegio de Postgraduados; México; delriverobautista@yahoo.com.mx.

Díaz-Hernández, Brenda Gabriela; MSc., Campo Experimental Cotaxtla, INIFAP; México; diaz.brenda@inifap.gob.mx.

García Romero, Ibone Aydee; MSc., PhD., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; iagarcia@unal.edu.co.

Giampapa Brucato María Graziella; PhD., Centro de Botánica Tropical, Facultad de Ciencias;

Universidad Central de Venezuela; Venezuela; mariagraziellabrucato@yahoo.com.

González Sayer, Sandra Milena; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; milenasyer@gmail.com.

Guerrero Castro, Rodrigo Armando; MSc Economía, Gestión de la Innovación; Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco; México; roarmando.gc@gmail.com.

Guzmán Valdivia, César Humberto; PhD., Docente-Investigador de Ingeniería Mecatrónica; Universidad Politécnica de Zacatecas; México; hello\_ingeniero@hotmail.com.

Hoyos Sánchez, Rodrigo Alberto; PhD., Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Agropecuarias; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; rhoyos@unalmed.edu.co.

León, Jorge; PhD., Lab de Microbiología Ambiental y Biotecnología; Univ. Nacional Mayor de San Marcos; Perú; jleong@unmsm.edu.pe.

López G., Ana María; PhD., Grupo de investigación en Biodiversidad y Biotecnología; Universidad Tecnológica de Pereira; Colombia; alopez@utp.edu.co.

Lugo González, Esther; PhD., Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey; México; esther.lugo@itesm.mx.

Lupo Pasin, Bryshila; PhD., Programa de Ing. Agroindustrial, Dpto. de Procesos Agroindustriales; Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado - UCLA; Venezuela; bryshilalupo@ucla.edu.ve.

Machado, W. Daniel; MSc., Laboratorio de Investigaciones Ambientales, Sección Ingeniería y Proyectos Agroindustriales; Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres; Argentina; daniel.machado@eeaac.org.ar.

Martínez, Carlos A.; MSc., Ing Agron., Universidad del Valle; Colombia; carlosmartinez425@gmail.com.

Mojica-Nava, Eduardo; PhD., Profesor Asociado, Depto de Ingeniería Electrónica; Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; emojican@unal.edu.co.

Molina Salazar, Raúl Enrique; PhD. Depto de Economía, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; México; molinara\_2005@yahoo.com.mx.

Molphe Balch, Eugenio Pérez; PhD., Dpto. de Química. C. de Ciencias Básicas, Unidad de Biotecnología Vegetal; Universidad Autónoma de Aguascalientes; México; eperezmb@correo.uaa.mx.

Orberá Ratón, Teresa; PhD., Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales; Universidad de Oriente; Cuba; torbera@cebi.uo.edu.cu.

Otálvaro Álvarez, Ángela María; PhD., Profesora Asociada; Universidad de la Salle; Colombia; amotalvaro@unisalle.edu.co.

Pabón, Miguel A.; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; miguelpabon@gmail.com.

Panopoulou, Giota; MSc., PhD Subsecretaría de Integración y Desarrollo del Sector Salud; México; giota.panopoulou@salud.gob.mx.

Peraza Arias, Andrés Ricardo; MSc.(c), Ingeniero Agrónomo, Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá; Colombia; andresp8503@gmail.com.

Perera, María Francisca; PhD., Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC); Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA); Argentina; franciscaperera@eeaac.org.ar.

Pinzón Gutiérrez, Yeimy Alexandra; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá; Colombia; yeialep@gmail.com.

Pinzón, Yeimy; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; yeialep@gmail.com.

Posso-Terranova, Andrés; MSc., cPhD, Department of Biology; University of Saskatchewan; Canada; andres.rosso@usask.ca.

Ramírez, Pablo; PhD., Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas; Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Perú; pramirez@unmsm.edu.pe.

Reguero Reza, María Teresa; MSc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; mtregueror@unal.edu.co.

Rengifo G., Ana Lucía; Bsc., cPhD Ciencias Biológicas; Pontificia Universidad Javeriana; Colombia; anarengifog@gmail.com.

Rodríguez Monroy, Mario; Profesor Titular C, Depto. de Biotecnología; Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI-IPN; México; mmonroy@ipn.mx.

Rosas García, Ninfa María; PhD., Profesora Titular B, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; nrosas@ipn.mx.

Rugeles S., Paula Andrea; MSc Recursos Fitogenéticos Neotropicales, Facultad de Ciencias Agropecuarias; Universidad Nacional de Colombia sede Palmira; Colombia; paularugeles@yahoo.com.

Ruiz Avila, Camilo Andrés; MSc.(c), Ing Agron, Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; caaruzav@unal.edu.co.

Sanchez Nieves, Jimena; PhD., Depto de Biología, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; Colombia; jsanchezn@unal.edu.co.

Sandoval, Georgina; PhD., Unidad de Biotecnología Industrial; Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, CIATEJ; México; gsandoval@ciatej.mx.

Tacoronte B., Melangel; PhD., Investigadora cultivos in vitro; Universidad de Los Andes; Venezuela; tacoront@ula.ve.

Uffo, Odalys; PhD., Laboratorio de Genética Molecular; Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Censa; Cuba; uffo@censa.edu.cu.

Vilchez P., Jorge; Profesor Asociado, MSc Biotecnología Vegetal, Depto de Botánica, Lab Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía; Universidad del Zulia; Venezuela; jvilchezp@fa.luz.edu.ve.

Villegas, Liliba B.; PhD., Instituto de Química San Luis (INQUISAL-CONICET); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; Argentina; lbvilleg@outlook.com.

## Autores – Authors

### A

Adiel A., Iván; Ingeniero agrónomo; Universidad de los Llanos; Colombia; ivanavilamoraes@hotmail.com.

Aguiar-Pérez, Luis Antonio; Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrados e Investigación; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; laguilarp0600@egresado.ipn.mx.

Albany de Vilchez, Nilca Rosa; Departamento de Química; Universidad del Zulia; Venezuela; nalbany@fa.luz.edu.ve.

Albarran, José Gerardo; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; jgalbarran@inia.gob.ve.

Andrade, Ernesto; I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; Colombia; andrade@unillanos.edu.co.

Arellano-Litardo, Ana C.; Centro de Investigación y Desarrollo, Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE); Ecuador.

Ávila-Morales, Iván A.; I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; Colombia; ivanavilamoraes@hotmail.com.

Ayala-Lozano, Juan Francisco; Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrados e Investigación; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; jayalal1300@alumno.ipn.mx.

### B

Beltrán Herrera, Javier Darío; PhD. Fitopatología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal; Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre; Colombia; darbelt2003@yahoo.com.

Buitrago Hurtado, Gustavo; IQ, Msc., Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia; Colombia; gbuitragoh@unal.edu.co.

Bustamante Rodríguez, Silvia Lizette; MCs, Grupo de Investigación sobre el Cultivo de Name; Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá; Colombia; slbustamanter@unal.edu.co.

### C

Capdesuñer Ruiz, Yanelis; MSc, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas; Universidad de Ciego de Ávila; Cuba; ycapdesuner@bioplantassu.cu.

Carmona Wilches, Oscar Elías; Bióloga. Laboratorio de Biotecnología Vegetal; Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre; Colombia; menfis2226@hotmail.com.

Casado, Raúl; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; casadobatista@yahoo.es.

Castañeda Ruiz, Rafael F.; PhD ciencias agrícolas, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT); Cuba; rfcastaneda@inifat.co.cu.

Castro, Liliana; PhD, Profesora Escuela de Ingeniería Química; Universidad Industrial de Santander; Colombia; licasmol@uis.edu.co.

Condori-Huamanga, Jose; Departamento Académico de Física; Universidad Nacional de San Agustín (UNSA); Perú; biologiaacuaticausa@gmail.com.

Cruz Jiménez, Elicet; PhD ingeniería industrial; Universidad Politécnica de Cataluña y Directora técnica en IALE Tecnología; España; elicet@iale.es.

Cuervo, Claudia; Bióloga, PhD. en Ciencias Biológicas, Docente Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología; Pontificia Universidad Javeriana; Colombia; claudia.cuervo@javeriana.edu.co.

### D

Díaz Narváez, Lucía Candelaria; Bióloga. Laboratorio de Biotecnología Vegetal; Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre; Colombia; lucadina@537hotmail.com.

Díaz, Andy; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela.

Dueñas-Gonza, Alex; Laboratorio de Biología Acuática, Departamento Académico de Biología; Universidad Nacional de San Agustín (UNSA); Perú; biologiaacuaticausa@gmail.com.

### E

Escalante, Humberto; PhD, Profesor Escuela de Ingeniería Química; Universidad Industrial de Santander; Colombia; escala@uis.edu.co.

### F

Fernández, José; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; jgfernandez@inia.gob.ve.

Fischer, Fanny C.; Centro de Investigación y Desarrollo, Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE); Ecuador.

Franco-Correa, Marcela; Microbióloga, PhD Biología Agraria, Docente Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología; Pontificia Universidad Javeriana; Colombia; franco@javeriana.edu.co.

### G

Gallo Rodríguez, Madelín; MSc, UCTB Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán. Sancti Spíritus; Cuba.

García González, Estefanía; Ingeniera Agroindustrial; Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira; Colombia; egarciagon@unal.edu.co.

García Lugo, Pablo J.; PhD Ciencias Biológicas; Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Depto de Biología; Venezuela; pgarcial@ula.ve.

Gómez-Beltrán, Liseth; I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; Colombia; ladgb1228@gmail.com.

González M., Leonardo; cMSc Fisiología Vegetal; Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; Colombia; Leonardo.gonzalez@uptc.edu.co.

Gonzalez, Ohitza; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; adlopez@inia.gob.ve.

Guerrero Cardena, Balmore Ruizdael; Lic. en Biología, MSc Biotecnología de Microorganismo; Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Depto de Biología; Venezuela; balmoregc@gmail.com.

### H

Hernández de la Torre, Martha; PhD, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas; Universidad de Ciego de Ávila; Cuba.

Huarachi-Olivera, Ronald; Laboratorio de Biología Acuática, Departamento Académico de Biología; Universidad Nacional de San Agustín (UNSA); Perú; rhuarachi@unsa.edu.pe.

### K

Korneva, Sofía B.; Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL); Ecuador.

### L

Lara Mantilla, Cecilia; PhD. Química. GRUBIODEQ (Grupo de Investigación en Biotecnología). Facultad de Ciencias Básicas; Universidad de Córdoba; Colombia; clara@unicordoba.edu.co.

León de Sierralta, Silvia; Departamento de Química; Universidad del Zulia; Venezuela.

Lloveras Macia, Joaquim; PhD, Ingeniero Industrial. Coordinador del programa de doctorado de Proyectos de Innovación Tecnológica en la ingeniería de producto y proceso; Universitat Politècnica de Catalunya; España; j.lloveras@upc.edu.

**M**

Marín R., Carlos; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; cmarin@inia.gob.ve.

Marín-Batista José; cMSc, Universidad Industrial de Santander; Colombia; jdmbatista05@gmail.com.

Martínez Ferrer, Leonardo Javier; Departamento de Botánica; Universidad del Zulia; Venezuela.

Molina Pulgar, Miguel Ángel; Departamento de Química; Universidad del Zulia; Venezuela.

Morillo Piña, Osmar T.; Ingeniero Químico, cPhD en Biotecnología de Microorganismo; Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Depto de Biología; Venezuela; osmthom@yahoo.com.

Morillo-Coronado, Ana Cruz; PhD, Ing. Alimentos; Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC); Colombia; ana.morillo@uptc.edu.co.

Morillo-Coronado, Yacenia; PhD, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; Colombia; ymorillo@unillanos.edu.co.

Mujica, Yris; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; ymujica@inia.gob.ve.

**N**

Nava Ferreira, Alba Ruth; Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía; Universidad del Zulia; Venezuela.

Negrete Peñata, Jorge Luis; MSc Biotecnología. GRUBIODEQ (Grupo de Investigación en Biotecnología). Facultad de Ciencias Básicas; Universidad de Córdoba; Colombia; Jorkaett14@gmail.com.

**P**

Pacheco-Salazar, David G.; Departamento Académico de Física; Universidad Nacional de San Agustín (UNSA); Perú; biologiaacuaticausa@gmail.com.

Pincay-Flores, Astolfo; Presidente Centro de Investigación y Desarrollo, Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE); Ecuador; uncecaniculoresecuador@hotmail.com.

Prada-Salcedo, Luis Daniel; Microbiólogo Industrial, MSc. en Microbiología, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología; Pontificia Universidad Javeriana; Colombia; lprada@javeriana.edu.co.

Prieto-Correal, Gloria Carolina; Microbióloga Industrial, Facultad de

Ciencias; Pontificia Universidad Javeriana; Colombia; g.prieto@javeriana.edu.co.

**Q**

Quiñones Galvez, Janet ; MSc, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantas; Universidad de Ciego de Ávila; Cuba.

**R**

Ramos Duarte, Víctor Andrés; Grupo de Investigación sobre el Cultivo de Ñame; Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá; Colombia; varamosd@unal.edu.co.

Ramos-Leal, Miguel; Laboratorio de Biotecnología, Dpto. Microbiología y Virología, Facultad de Biología; Universidad de La Habana; Cuba; fitopatologia18@iift.cu.

Raz, Lauren; PhD., Instituto de Ciencias Naturales; Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá; Colombia; lraz@unal.edu.co.

Rincón Velandía, Javier; Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia; Facultad de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá; Colombia; jrinconv@unal.edu.co.

Rivas Paneca, Maribel; MSc, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantitas; Universidad de Ciego de Ávila; Cuba.

Rodríguez Hernández, Erinelvis; MSc, UCTB Estación Experimental del Tabaco de Cabaiguán. Sancti Spiritus; Cuba.

Rojas Cardozo, Maritza Adelina; Grupo de Investigación en Fitoquímica y Farmacognosia. Facultad de Farmacia; Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá; Colombia; marojasc@unal.edu.co.

Romero-Angeles, Beatriz; Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Unidad Azcapotzalco; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; romerobeatriz97@hotmail.com.

**S**

Salazar García, Aída; cPhD Departament de Projectes d'Enginyeria; Universitat Politècnica de Catalunya; España; aida.salazar@estudiant.upc.edu.

Salazar, Efraín; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; esalazar@inia.gob.ve.

Sandrea, Yanet; cMSc, Mención Genética. Facultad de Agronomía; Universidad Central de Venezuela; Venezuela; melanigs@hotmail.com.

Schmidt, Alexandra; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto

Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; aschmidt@inia.gob.ve.

Serna Cock, Liliana; PhD, Ing. Alimentos; Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira; Colombia; lserna@unal.edu.co.

Soto-Flores, Joe; Centro de Microscopia Electrónica; Universidad Nacional de San Agustín (UNSA); Perú; biologiaacuaticausa@gmail.com.

**T**

Tola, Nataly A.; Centro de Investigación y Desarrollo, Unión Nacional de Cañicultores del Ecuador (UNCE); Ecuador.

Torres Vielma, Yzolet; Lcda. en Biología; Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Depto de Biología; Venezuela; yzolet@hotmail.com.

Torres-San Miguel, Christopher René; Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrados e Investigación; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; ctorress@ipn.mx.

**U**

Urriolagoitia Calderón, Guillermo; PhD Ingeniería mecánica, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (ESIME-Zacatenco). Sección de Estudios de Posgrado e Investigación (SEPI); Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; urrio332@hotmail.com.

Urriolagoitia-Calderón, Guillermo Manuel; Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrados e Investigación; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; guirri@hotmail.com.

Urriolagoitia-Sosa, Guillermo; Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Sección de Estudios de Posgrados e Investigación; Instituto Politécnico Nacional (IPN); México; urrio332@hotmail.com.

**V**

Vegas García, Ariadne; Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias; Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas; Venezuela; avegas@inia.gob.ve.

Vilchez Perozo, Jorge Alberto; Departamento de Botánica; Universidad del Zulia; Venezuela.

**Y**

Yanes Paz, Ermis; MSc, Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplantitas; Universidad de Ciego de Ávila; Cuba.

Yapo-Pari, Úrsulo; Laboratorio de Biología Acuática, Departamento Académico de Biología; Universidad Nacional de San Agustín (UNSA); Perú; biologiaacuaticausa@gmail.com.

# 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 presentan 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: Cenicafé, 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>

REVISTA COLOMBIANA DE  
**BIOTECNOLOGÍA**

**TARJETA DE SUSCRIPCIÓN**



Nombre: \_\_\_\_\_ Apellidos: \_\_\_\_\_

Compañía: \_\_\_\_\_

Cargo: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Estado/Dpto.: \_\_\_\_\_

País: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

**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).



