

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

VOL II

 EDITORA
ARTEMIS
2023

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

VOL II

 EDITORA
ARTEMIS
2023



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Manuel Simões
Imagem da Capa	Vivilweb/123RF
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil
Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil
Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México
Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil
Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.^ª Dr.^ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*
Prof.^ª Dr.^ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*
Prof.^ª Dr.^ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*
Prof.^ª Dr.^ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*
Prof.^ª Dr.^ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*
Prof.^ª Dr.^ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. José Cortez Godínez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Díaz, Instituto Politécnico Nacional, México
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof.^ª Dr.^ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*
Prof.^ª Dr.^ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^ª Dr.^ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil
Prof.^ª Dr.^ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil



Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal
Prof.^a Dr.^a Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana*, Cuba
Prof.^a Dr.^a Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México
Prof.^a Dr.^a Odara Horta Boscolo, *Universidade Federal Fluminense*, Brasil
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru
Prof.^a Dr.^a Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.^a Dr.^a Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof.^a Dr.^a Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil
Prof.^a Dr.^a Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University*, Russia
Prof.^a Dr.^a Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil
Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León*, Espanha

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades: vol. II / Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2023.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-87396-83-5

DOI 10.37572/EdArt_310523835

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina.
I.Simões, Manuel.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



PREFÁCIO

A investigação científica e o desenvolvimento tecnológico têm permitido criar soluções para os mais diversos problemas sociais. Contudo, os avanços científicos e tecnológicos não se podem distanciar das abordagens de disseminação relevantes, que permitam que o conhecimento seja disponibilizado de forma criteriosa e compreensível à comunidade académica, às empresas/indústria e ao público em geral.

O segundo volume da edição “Estudos em Biociências e Biotecnologia” é composto por 12 capítulos que descrevem avanços significativos das ciências e tecnologias biológicas aplicadas a diversas áreas de investigação, complementando os trabalhos publicados no primeiro volume. Em particular, este volume, reúne capítulos relacionados com as ciências biológicas nas seguintes áreas/tópicos: biomédica (capítulos 1 e 2); biologia funcional e biotecnologia de plantas (capítulos 3 a 6); produção e proteção de alimentos (capítulos 7 a 9); ambiente e biorrecursos (capítulos 10 a 12).

O leitor deste volume beneficiará de um conjunto de informação inovadora que, além de ser um excelente contributo científico, contribuiu para dar resposta a diversos objetivos de desenvolvimento sustentável estabelecidos pela Assembleia Geral das Nações Unidas.

Manuel Simões

SUMÁRIO

MEDICINA

CAPÍTULO 1..... 1

AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL PROVENIENTES DE POBLACIÓN MEXICANA: PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE TERAPIA CELULAR

Flor Yohana Flores Hernández
Héctor Miguel Ramírez Bedoy
Laura Susana Villa García Torres
Gleira Lisseth González Pelayo
Luz Patricia Escobar Santibáñez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238351

CAPÍTULO 2..... 14

ALTERACIÓN EN VIABILIDAD CELULAR, DAÑO EN ADN Y CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE HSP70 EN LEUCOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A RADIACIÓN UVA Y CALOR

David Alejandro García López
Rosa Gabriela Reveles Hernández
Rosa María Ramírez Santoyo
Luz Elena Vidales Rodríguez
María Argelia López Luna
Sergio Hugo Sánchez Rodríguez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238352

BIOLOGIA FUNCIONAL E BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

CAPÍTULO 3..... 26

IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS DE *Citrus aurantifolia* X *Citrus limon* UTILIZANDO MARCADORES DE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (SSR)

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán
Mario Orozco Santos
Claudia Yared Michel López
Paola Andrea Palmeros Suárez
Mayra Guadalupe Mena Enriquez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238353

CAPÍTULO 4..... 40

DINÁMICA DE CALIDAD, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE NOGAL PECANERA
(*CARYA ILLINOINENSIS* KOCH)

Joe Luis Arias-Moscoso
Francisco Cadena-Cadena
Felipe Reynaga Franco
Alejandro García Ramírez
Gilberto Rodríguez Pérez
Dulce Alondra Cuevas-Acuña
José Eliseo Ortiz Enríquez
Jesús Arnulfo Márquez Cervantes

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238354

CAPÍTULO 5..... 45

GERMINACIÓN *in vitro* DE TRES ESPECIES DE ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE LA
REGIÓN SUROCCIDENTAL DEL ESTADO DE MICHOACÁN, MÉXICO

María Guadalupe Mendoza García
Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán
Susana de la Torre Zavala
Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238355

CAPÍTULO 6..... 63

ANÁLISIS DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS DE *DIAPHORINA CITRI* KUWAYAMA EN
EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

Araceli Flores Aguilar
Benito Hernández Castellanos
Julio César Castañeda Ortega
Diana Pérez Staples
Lourdes Cocotle Romero

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238356

PRODUÇÃO E PROTEÇÃO ALIMENTAR

CAPÍTULO 7..... 69

EL POLVO DE DIATOMEAS ES UNA OPCION SUSTENTABLE PARA PROTECCIÓN DE
MAIZ ALMACENADO

José Guadalupe Loya Ramírez

Félix Alfredo Beltrán Morales
Sergio Zamora Salgado
Francisco Higinio Ruiz Espinoza
Jesús Navejas Jiménez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238357

CAPÍTULO 8.....75

ANÁLISIS BIOECONÓMICO DEL CULTIVO INTENSIVO FOTO-HETEROTRÓFICO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN ALTA SALINIDAD CON REPOSICIÓN MINIMA DE AGUA, PARA EL CICLO VERANO-OTOÑO

Luis Daniel Moreno-Figueroa
Humberto Villarreal-Colmenares
Alfredo Hernández-Llamas
José Naranjo-Páramo
Mayra Vargas-Mendieta

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238358

CAPÍTULO 9.....82

¿CÓMO VA EL CAMBIO DE ESTATUS DE LOS CULTIVOS/ALIMENTOS NUS EN CULTIVOS/ALIMENTOS NO-NUS?

Ximena Rocío Cadima Fuentes

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238359

AMBIENTE E BIORRECURSOS

CAPÍTULO 10..... 93

DECOMPOSITION OF THE INVASIVE ACACIA *LONGIFOLIA* IN A PERI-URBAN STREAM

Manuela Abelho

 https://doi.org/10.37572/EdArt_31052383510

CAPÍTULO 11..... 105

REMOCIÓN DE CINCO PRODUCTOS FARMACÉUTICOS CATALOGADOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN MEDIO ACUOSO UTILIZANDO LA ESPECIE VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)

Miriam Checa-Artos
Daynet Sosa del Castillo
Eulalia Vanegas María

Omar Ruiz-Barzola

Milton Barcos-Arias

 https://doi.org/10.37572/EdArt_31052383511

CAPÍTULO 12122

GIBBERELLIC ACID DETERMINATION IN AGRICULTURAL SOILS

Gabriel Hernández-Morales

José Enrique Botello-Álvarez

Marcela Cárdenas-Manríquez

Ricardo Gómez-González

Pasiano Rivas-García

Brenda Ríos-Fuentes

Ramiro Rico-Martínez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_31052383512

SOBRE O ORGANIZADOR.....132

ÍNDICE REMISSIVO133

CAPÍTULO 1

AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL PROVENIENTES DE POBLACIÓN MEXICANA: PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE TERAPIA CELULAR

Data de submissão: 29/04/2023

Data de aceite: 16/05/2023

Flor Yohana Flores Hernández

Biología Médica y
Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco
Av. Normalistas 800
Col Jardines Alcalde C.P. 44270
Guadalajara, Jalisco, México
<https://orcid.org/0000-0002-4231-1195>

Héctor Miguel Ramírez Bedoy

Biología Médica y
Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco
Av. Normalistas 800
Col Jardines Alcalde C.P. 44270
Guadalajara, Jalisco, México
<https://orcid.org/0009-0009-4349-1544>

Laura Susana Villa García Torres

Biología Médica y
Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco
Av. Normalistas 800
Col Jardines Alcalde C.P. 44270
Guadalajara, Jalisco, México
<https://orcid.org/0000-0002-9024-0344>

Gleira Lisseth González Pelayo

Biología Médica y
Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco
Av. Normalistas 800
Col Jardines Alcalde C.P. 44270
Guadalajara, Jalisco, México

Luz Patricia Escobar Santibáñez

Cirugía Maxilofacial del
Hospital Civil "Juan I. Menchaca"
Guadalajara, Jalisco, México

RESUMEN: Las células troncales, madre o células somáticas mesenquimales de pulpa dental se clasifican dentro de las células madre mesenquimales adultas, cuentan con capacidad multipotente y son un blanco de investigación en el desarrollo de terapia celular y medicina regenerativa. Su obtención no invasiva las promueve como candidatas para la investigación en futuras terapias. Los procesos de aislamiento, cultivo, así como la caracterización requieren un análisis que ofrezca información sobre las poblaciones celulares con las que se trabaja, es decir, que estas cuenten con características específicas de células troncales. Para ello, la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica propuso desde el 2006, que estas deberían expresar al menos los marcadores CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos

hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B, lo cual es importante para consolidar la identidad de células troncales mesenquimales. Este análisis se puede realizar por medio del uso de anticuerpos dirigidos a estos marcadores; la técnica mayormente utilizada es la citometría de flujo. En este trabajo se establecieron métodos de obtención del tejido pulpar, aislamiento, cultivo y caracterización de células troncales provenientes de pulpa dental, así como algunas perspectivas de aplicación. Estos métodos se llevaron a cabo en muestras de piezas dentales procedentes de la población nacional del estado de Jalisco.

PALABRAS CLAVE: Células madre. Pulpa dental. Regeneración.

ISOLATION, CULTURE, AND CHARACTERIZATION OF DENTAL PULP STEM CELLS FROM MEXICAN POPULATION: PERSPECTIVES IN CELL THERAPY DEVELOPMENT

ABSTRACT: Dental pulp stem cells are classified among adult mesenchymal stem cells, they have multipotent capability, and they are a research target in the development of cell therapy and regenerative medicine. Their non-invasive obtention promotes them as candidates for research in future therapies. The isolation processes, culture, as well as the characterization, require an analysis that offers information about the cells populations with which one is working, i.e. that these have specific characteristics of stem cells, that is why the International Society for Cell & Gene Therapy proposed since 2006, that they had to express at least the markers CD73, CD90 and CD105 in the absence of hematopoietic antigens such as CD34, CD45, monocytes, macrophages, and B lymphocytes markers, all this is important to consolidate mesenchymal stem cells identity. This analysis can be performed through the use of antibodies targeting these markers; the most widely used technique is flow cytometry. In this work, methods for pulpal tissue obtention, isolation, culture, and characterization of dental pulp-derived stem cells were established, as well as some application prospects. These methods were carried out in tooth samples from the national population of the state of Jalisco.

KEYWORDS: Stem cells. Dental pulp. Regeneration.

1 INTRODUCCIÓN

Las células troncales de pulpa dental (DPSC, por sus siglas en inglés) se encuentran dentro de la cámara dental en un tejido suave que contiene células del tejido conectivo, células mesenquimales indiferenciadas, fibras neurales, vasos sanguíneos y linfáticos; la pulpa dental se encuentra rodeada de dentina mineralizada. Las funciones principales de la pulpa dental son la producción de dentina y el mantenimiento de la vitalidad de la dentina. Se clasifican dentro de las células madre ecto-mesenquimales y se derivan de la cresta neural (Masthan et al., 2013; Yasui et al., 2017).

Las DPSCs tienen un alto potencial proliferativo, una extensa auto-renovación y un gran potencial para diferenciarse hacia linajes celulares como osteogénicos, condrogénicos, adipogénicos y neurogénicos. Pueden obtenerse de piezas dentales

permanentes, dientes primarios, caducifolios exfoliados y apicales, así como de supernumerarios de forma no invasiva aprovechando el órgano dentario, que es una pieza de desecho (Fageeh, 2021).

Se ha comparado la multipotencia de las DPSC con la de las células madre de médula ósea, ya que estas fueron las primeras células troncales mesenquimales en aislarse. Se ha demostrado que la proliferación, la disponibilidad y el número de células DPSCs son mayores (Gong et al., 2022). Además, su aislamiento se favorece por su gran capacidad de adherencia al plástico cuando son cultivadas, de manera que es posible descartar diversas poblaciones celulares (Aljamie et al., 2016; Leadbeater et al., 2016).

Para verificar la identidad de las células aisladas, se realizan usualmente técnicas de selección clonal, como la citometría de flujo, detectando poblaciones celulares en función de los marcadores de superficie acoplados a fluorocromos (Bourin et al., 2013). De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica, o ISCT, por sus siglas en inglés (International Society for Cell & Gene Therapy), las células troncales mesenquimales deben cumplir con características específicas que garanticen la identidad de las poblaciones obtenidas de cultivos primarios. Se busca la presencia de marcadores como lo son CD44, CD73, CD90 y CD105; el conjunto de estos marcadores es una característica de células indiferenciadas, en donde se corrobora que aún representan un tejido definido. Se espera que la población de células troncales mesenquimales exprese estos marcadores en un 95%, sin embargo, es necesario que las poblaciones sean negativas para CD45, CD34, CD14, C11b, CD79 y CD19, los cuales son marcadores de superficie característicos de células de tipo hematopoyético, con lo que se corrobora la pureza de las poblaciones celulares (Wright et al., 2021).

Las terapias con células madre se han convertido en métodos de tratamiento de múltiples enfermedades. Diversas investigaciones se han enfocado hacia la promoción de terapia celular aplicada a padecimientos crónicos, entre los cuales se encuentran defectos bucales y maxilofaciales, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. En los últimos años, los estudios se han centrado en la aplicación de células madre e ingeniería tisular para reparar y regenerar las estructuras corporales, disciplina conocida como medicina regenerativa. Se ha planteado la hipótesis de que las células troncales podrían desempeñar un papel clave, ya que pueden ser fácilmente cultivadas e inducidas a procesos de diferenciación para formar diferentes tipos de células especializadas, y con esto, llevar a cabo el objetivo de la ingeniería tisular, es decir, restaurar la vitalidad y la función de tejido enfermo y traumatizado (Wright et al., 2021).

Las células madre de pulpa dental humana se han obtenido por métodos basados en diversos experimentos e investigaciones, entre ellos encontramos el reportado por

Raouf y colaboradores en el año 2014, realizando el aislamiento y cultivo de las DPSCs mediante disgregación enzimática del tejido. Ellos reportaron que estos cultivos crecieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal (FBS) a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad (Mohammad El-Sayed Hassouna et al., 2018).

Por otra parte, Lin y colaboradores, en el mismo año, reportaron otro método de aislamiento en el que las células madre de la pulpa dental humana fueron extraídas de piezas dentales, se congelaron y después se almacenaron a -196°C en tanque de nitrógeno líquido durante 24 horas. Durante la congelación, las células se suspendieron en medio de cultivo que contenía 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Los resultados reportados sobre esta metodología fueron que cuando el medio de congelación no contenía DMSO, las tasas de supervivencia de DPSCs aumentaban una vez que se descongelaban y se cultivaban nuevamente. Dos años atrás, Gioventù y colaboradores reportaron una metodología en la que estudiaron cuatro dientes humanos, que criopreservaron haciendo micro canales en el órgano dentario con la ayuda de rayo láser para ser almacenados a -80°C. Este método ahorra tiempo en el aislamiento de células madre de pulpa dental antes de la criopreservación y, por lo tanto, reduce los costos iniciales y la carga de trabajo del procesado de las piezas dentales (Gioventù & Andriolo, 2012; Wang et al., 2022).

En la actualidad se buscan métodos efectivos, económicos y rápidos para lograr obtener células troncales mesenquimales de piezas dentales en áreas como la pulpa dentaria, para su uso tanto en investigación como en la clínica.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE ÓRGANOS DENTARIOS

Las piezas dentales fueron obtenidas por donación bajo consentimiento informado de los pacientes del área de cirugía maxilofacial del OPD (Organismo público descentralizado), siguiendo todos los procedimientos éticos, Dr. Juan I. Menchaca, realizando la extracción de las piezas dentales por cirujanos del mismo departamento, cuando por recomendación médica así se requería. Al ser obtenidas fueron colocadas en tubos cónicos de 15mL, los cuales contenían 3mL de medio RPMI-1640 adicionado con 5% de DMSO, 10% de albúmina humana, 10% de SFB, 100U/mL de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina y 0.25mg/mL de anfotericina B. Las piezas fueron transportadas en cadena fría en hieleras con geles refrigerantes, y en caso de ser necesario, se congelaron a -80°C. En lo posible, se procesaron en las primeras 12 horas después de la extracción.

2.2 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS DE PULPA DENTAL

Para la estandarización de los procesos de obtención de células troncales se utilizaron 30 muestras. En campana de flujo laminar, se procedió a descontaminar las piezas. Primeramente, se limpiaron con una gasa empapada con anfotericina-B 0.25mg/mL, posteriormente se colocaron en Iodopovidona 8%, PBS1x con 100U/100Mg/mL de Penicilina/Estreptomicina y finalmente en clorhexidina al 0.12%.

Para la obtención de las células del interior del órgano dentario, se probaron dos metodologías:

1. Se perforaron los órganos dentarios desde la corona hasta llegar a la cámara pulpar utilizando una pieza de mano de uso odontológico de alta velocidad. Para hacer la apertura se perforó la corona del diente con una fresa número 8 de carburo, posteriormente se utilizó una fresa del número 2 de carburo para establecer comunicación con la cámara pulpar y, por último, se utilizó una endo-Z para ampliar la cavidad con la finalidad de tener un mejor acceso a la cámara pulpar. En los casos donde se observaron ápices inmaduros, estos simplemente se retiraron con pinzas estériles.
2. Se cortó el órgano dentario a tercio cervical dividiendo corona y raíz, utilizando una pieza de mano de baja velocidad y un disco de diamante de doble vista con mandril, irrigando con agua y jeringa la pieza para evitar el sobrecalentamiento de la misma. Al llegar a la cámara se retiró el tejido pulpar mecánicamente con la ayuda de pinzas, cucharillas para dentina, así como limas Hedstroem y FlexoFile. Si se observaron restos de tejido, se realizaron lavados con DPBS o con el medio de cultivo celular α -MEM para obtener la mayor cantidad de tejido. Para separar tanto el tejido de los ápices inmaduros, como la pulpa dental, el tejido se fraccionó con bisturí y se colocó en digestión agregando 1mL de tripsina al 0.005%, la cual estaba diluida en DPBS. La solución se colocó en agitación a 160 rpm a temperatura regulada de 37°C por 20 minutos, vórtex 1 minuto, 20 minutos en agitación a 220rpm y un minuto en vórtex nuevamente. Esta suspensión fue centrifugada a 1500rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 5mL de medio α -MEM adicionado con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 10UM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 1% penicilina-estreptomicina 100U/100mg/mL y 0.25mg/mL de anfotericina B. Esta suspensión se colocó en botellas de cultivo de 25cm² ventiladas y se observaron al microscopio invertido a las 24 horas posteriores y diariamente para verificar que se encontrara libre de contaminación, así

como para monitorear si ya se observaban células adheridas. El medio fue reemplazado cada tercer día. Aproximadamente entre los 7 y 15 días se comenzaron a ver las primeras células en crecimiento en cúmulos o rosetas con morfología fibroblástica típica.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se utilizó medio D'MEM suplementado con 10% SBF y 200mM de L-glutamina. Cuando las células se expandieron, se sometieron a criopreservación.

2.3 CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DE PULPA DENTAL OBTENIDAS

Se realizó un análisis por citometría de flujo para identificar los siguientes marcadores de membrana: CD73, CD90, CD105 y adicionalmente CD44 (Becton Dickinson Human MSC analysis), así como para confirmar la ausencia de marcadores de tipo hematopoyéticos.

Las células se retiraron de la botella de cultivo con tripsina 0.005%, se contaron en una cámara de Neubauer y se colocaron 500,000 células en 300µL de PBS/BSA 0.1%, preparándose 9 microtubos con las mismas proporciones. Las células se fijaron con paraformaldehído frío al 4% agitándose a 120rpm durante 20 minutos; se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se prosiguió con el marcaje empleando los anticuerpos. Se colocaron 5 µL de los anticuerpos individuales en cada tubo correspondiente y se colocaron 10µL para los controles de isotipo, así como para el coctel positivo y negativo. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, protegidos de la luz y en agitación constante a 90 rpm. Se realizó un lavado para retirar el exceso de anticuerpos, agregándose 500µL de PBS/BSA 0.1% y se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 300µL de PBS/BSA 0.1%. Finalmente, se procedió a hacer el análisis en el citómetro Accuri C6 BD.

2.4 POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN MULTI-LINAJE DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL

Se realizó el cultivo de las células de pulpa dental en placas de seis pozos, colocándose un millón de células por cada uno. La diferenciación hacia osteoblastos (411D-250 Cell applications), adipocitos (811D-250 Cell applications) y condrocitos (411D-250 Cell applications), se realizó con medios formulados para dichos procesos; las células se cultivaron con los respectivos medios de diferenciación durante 24 días.

Para la confirmación de los tipos de células obtenidas después del proceso, se trabajó con tinciones como lo marca la Sociedad Internacional de Terapia Celular y

Génica para el aislamiento e identificación de células troncales. Se realizó tinción con rojo oleoso para identificar vacuolas lipídicas en las células diferenciadas hacia linaje adipocítico, tinción con azul alciano para identificación de fibras de colágena en las células diferenciadas hacia linaje condrogénico y, finalmente, se realizó la tinción de Von Kossá para evidenciar depósitos de calcio en células diferenciadas hacia linaje osteogénico.

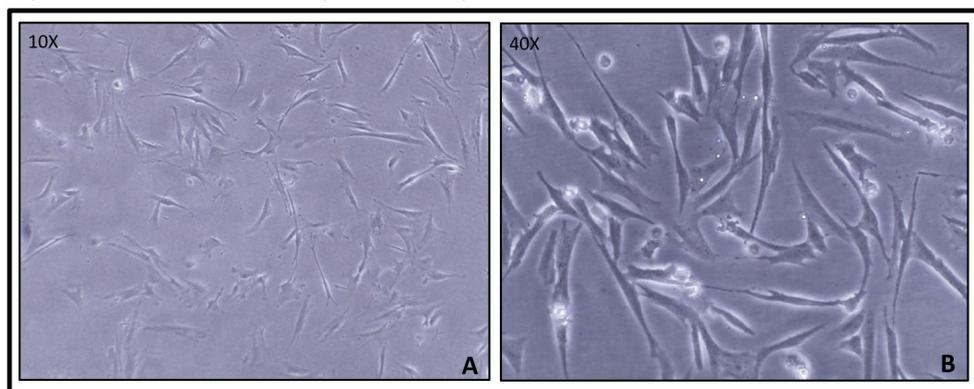
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CRECIMIENTO CELULAR DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LA PULPA DENTAL

Las células aisladas de la pulpa dental de las piezas recolectadas muestran una morfología fibroblastoide alargada, además, son adherentes al plástico. La morfología de las células aisladas se aprecia similar a la morfología descrita para células troncales mesenquimales.

En la figura 1 se muestran fotografías representativas del crecimiento de las células obtenidas en cultivo. Las primeras células en crecimiento se observaron entre los 7 y 15 días después del cultivo de los explantes de la pulpa dental.

Figura 1. Fotografías representativas del cultivo primario de células de pulpa dental. A) Células en crecimiento con ampliación 10X. B) Células en cultivo primario con ampliación de 40X.



Las colonias celulares en cultivo presentan una morfología fibroblastoide típica de las células troncales y de las hDPSCs, y son evidentemente adherentes al plástico en cultivo. Estas se empezaron a cultivar una vez estandarizado el método con las primeras piezas pertenecientes a 30 pacientes, por lo tanto, a partir de la muestra 31 se comenzó a tener cultivos en forma estandarizada, y se decidió llevar a cabo la metodología dos, es decir, cortar el órgano dentario separando la corona de la raíz, ya que se observó que al acceder a la cámara pulpar se generaba una menor cantidad de residuos de hueso y dentina que al perforar la pieza. Otra ventaja por la que se decidió la segunda metodología

fue debido a que se tenía un mejor acceso al tejido pulpar, pues se logró un diámetro de abertura mayor de las piezas. Posteriormente, se conformó una reserva de células que corresponde al cultivo de 30 pacientes, siendo equivalente a 59 cultivos, en donde las edades de 16, 18, 19, 23 y 25 años son las que presentaron mayor porcentaje de crecimiento (Figura 2).

Figura 2. Número de piezas procesadas de acuerdo a las edades de los individuos donantes. La tasa de proliferación celular más alta corresponde a individuos de entre 16 a 25 años.



3.2 EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS TRONCALES

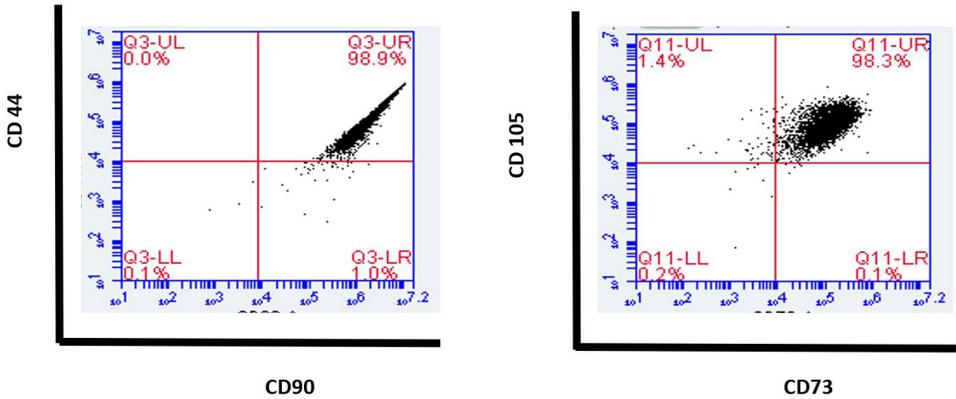
Se observó que las células de pulpa dental expresan los marcadores CD73, CD90, CD44 y CD105 en proporciones adecuadas de acuerdo con la ISCT, esto es, en un porcentaje de la población mayor al 95%. Por otra parte, no se observaron marcadores de tipo hematopoyéticos (CD34, CD45, CD56, CD14 y HLA), los cuales no deben presentarse en más del 2% de la población celular. En la tabla 1 se resumen los porcentajes de expresión de los marcadores de membrana característicos de células troncales mesenquimales encontrados; se muestran los resultados de tres muestras representativas de los cultivos primarios de células aisladas de pulpa dental (n=30).

Tabla 1. Expresión de marcadores de membrana en las células aisladas de la pulpa dental.

Muestra	Expresión de marcadores de membrana (% de expresión)				
	CD44	CD73	CD90	CD105	Marcadores hematopoyéticos
1	98	98.4	92.7	99.4	0.6
2	99.2	96.0	80.9	96.4	0.4
3	99.7	93.6	94.4	97.1	0.1

En la figura 3 se muestran los resultados del análisis por citometría de flujo, donde se muestran las dobles tinciones para los marcadores CD90 vs CD44 y CD73 vs CD105.

Figura 3. **Dot plot.** Expresión de receptores específicos de células troncales mesenquimales (muestra representativa). La población celular que se agrupa en los cuadrantes superior derecho de cada gráfico muestra la población positiva para los marcadores analizados, puesto que se muestran las dobles tinciones, evidenciando positividad por arriba del 95% para los cuatro marcadores.



Los diagramas de puntos muestran los porcentajes de la población que expresan marcadores específicos de células troncales. Las células positivas se ubican en el cuadrante superior derecho, tal como se observa en estas muestras representativas. El análisis para marcadores de tipo hematopoyético se muestra en la figura 4.5. Debido a que la población celular de estas muestras no expresa este tipo de marcadores, la población celular se concentra en el cuadrante inferior izquierdo.

Figura 4. Expresión de marcadores de tipo hematopoyético. Se muestra el análisis de la población celular en gráficos de puntos, donde se observan los cuatro canales de fluorescencia con los que se trabajaron respecto a la longitud de excitación de los fluorocromos acoplados al conjunto de marcadores hematopoyéticos.

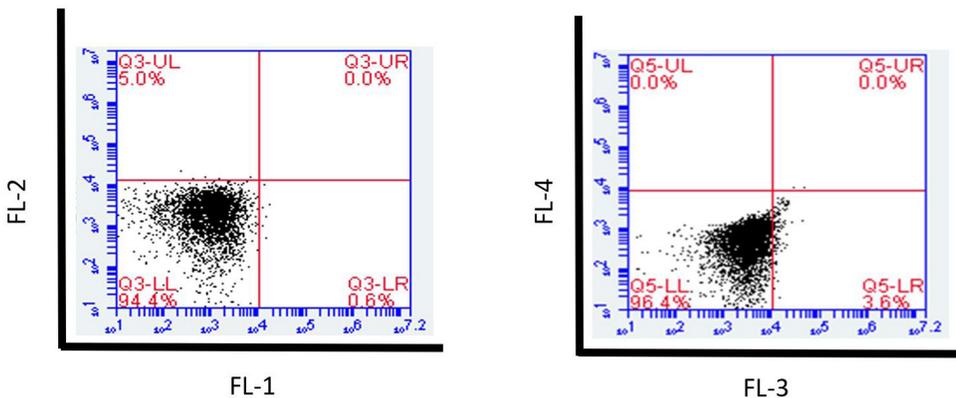
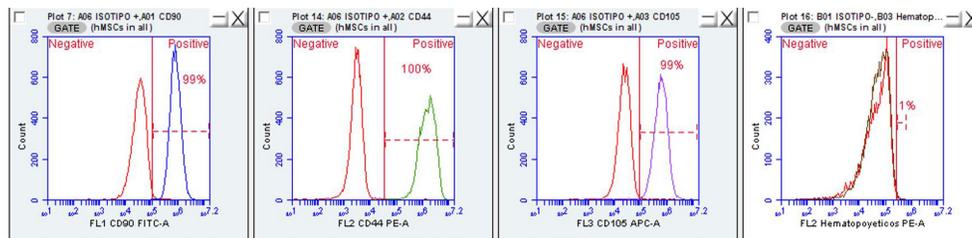


Figura 5. **Histogramas.** Expresión de receptores específicos de células troncales mesenquimales (muestra representativa). La población celular evidencia positividad por arriba del 95% para los marcadores.



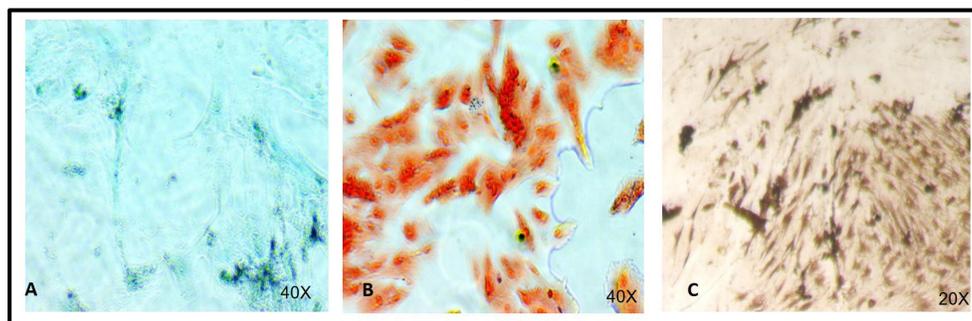
Las células aisladas no expresan marcadores de tipo hematopoyético, lo cual es una característica propia de las DPSC. Este grupo de marcadores corresponden a CD34 (marcador de célula endotelial), CD45 (leucocitario), CD14 y CD11 (marcadores de macrófagos y monocitos), CD79 y CD19 (marcadores de células B) y HLA-DL.

3.3 POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN MULTI-LINAJE

Las células aisladas de pulpa dental se sometieron a procesos de multidiferenciación, para corroborar su multipotencialidad, debiendo contar con la capacidad de diferenciarse hacia células de distintos linajes. Además, se realizaron tinciones como lo marca la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica para el aislamiento e identificación de células troncales.

La tinción con azul alciano evidencia fibras de colágena en la matriz extracelular, lo cual es muestra de la formación de condroblastos. Por otra parte, la tinción con rojo oleoso evidencia lípidos intracelulares aglomerados en vacuolas en el espacio citoplasmático, lo cual es característico de los adipocitos. Finalmente, la tinción de Von Kossá evidencia depósitos de calcio intracelulares aglomerados en el espacio citoplasmático, lo cual es una característica específica de los osteoblastos. En la figura 6 se muestran fotografías representativas de dichos procesos.

Figura 6. Tinciones de los distintos linajes celulares obtenidos a partir de DPSCs. A) Células condroblásticas teñidas con azul alciano. B) Células adipocíticas teñidas con rojo oleoso. C) Células osteoblásticas con tinción de Von Kossá.



Se observan en la imagen A, condroblastos obtenidos, las fibras de colágena características de este linaje, las cuales se tiñen de color azul celeste tal como se observa en la fotografía. En la imagen B, se percibe un conjunto de adipocitos obtenidos también a partir de DPSC, mostrándose en color rojo las vacuolas lipídicas en el espacio citoplasmático, las cuales son características de este linaje. Se observa en la imagen C, los osteoblastos obtenidos, la tinción de Von Kossá, apreciándose en color negro los depósitos de calcio que se encuentran en este tipo de células.

La capacidad de las células aisladas para formar estos tres linajes celulares muestra que tienen el potencial para formar células distintas provenientes de las diferentes capas germinales en el desarrollo.

4 CONCLUSIONES

El estudio de las DPSC abre camino en la investigación en áreas como bioingeniería de tejidos y terapia celular en enfermedades crónico-degenerativas. El crecimiento en estas áreas médico-biotecnológicas podría poner al alcance de los pacientes una cura efectiva y presentar avances significativos en la calidad de vida de las personas. Es necesario desarrollar nuevas tecnologías que permitan avanzar en nuevas terapias, con el fin de proporcionar alternativas de tratamientos actuales que otorguen opciones funcionales de tratamientos.

En este estudio se observó que las muestras de la población entre los 16 a los 25 años, presentan índices mayores de proliferación celular en cultivo que el resto de las edades. Se ha sugerido que la tasa de renovación de estas células aumenta en este periodo de vida, en el cual, comienzan a emerger los terceros molares o tradicionalmente llamados “muelas del juicio”, las cuales son extraídas ya sea por recomendación médica o por razones estéticas. Por tal motivo, pueden ser una fuente de células troncales mesenquimales aprovechable y de obtención no invasiva.

El potencial de las DPSC para diferenciarse hacia distintos linajes demuestra que estas pueden formar diversos tipos celulares bajo estímulos específicos de factores de transcripción y moléculas. Se ha reportado que a partir de las DPSC se ha logrado reparar tejido nervioso y retina (Leadbeater et al., 2016), obtener por diferenciación cardiomiocitos y la regeneración dentaria debido a su gran potencial osteogénico (Guo et al., 2022), además, se han podido obtener células endocrinas pancreáticas (Jiang et al., 2007), por lo que son candidatas en perspectivas de aplicación en terapia celular y medicina regenerativa en enfermedades crónico-degenerativas (como la diabetes mellitus), reparación de cartílago, terapia en enfermedad de Alzheimer al obtener células de tipo neuronal, entre otras (Chen et al., 2016).

Las técnicas de cultivo y aislamiento de DPSCs deben ser estudiadas con la finalidad de ofrecer la obtención de una cantidad eficiente de células indiferenciadas a partir de la pulpa dental, utilizando medios de mantenimiento que disminuyan costos y que permitan mantener el fenotipo de las células, tal es su estado indiferenciado. Por otra parte, las técnicas de cultivo para acceder a la cámara pulpar deben garantizar seguridad e higiene, puesto que existe una gran cantidad de microorganismos bucales que son potencialmente un riesgo de contaminación en los cultivos celulares.

Por otro lado, es necesario contar con técnicas que permitan conocer el fenotipo de las células que se cultivan. En este trabajo, a través de técnicas de citometría de flujo, se caracterizaron las células obtenidas en cultivo mediante el análisis de marcadores de membrana tal como lo sugiere la ISCT, ya que deben contar con características específicas que permitan conocer su identidad, puesto que existen poblaciones celulares en la pulpa dental que morfológicamente suelen confundirse con las células mesenquimales indiferenciadas, tal como fibroblastos, células progenitoras neuronales, entre otras.

En nuestro país es necesario el desarrollo de investigación en áreas como la terapia celular, para ofrecer en un futuro nuevas terapias aplicadas a padecimientos crónicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljamie, M., Alessa, L., Noah, R., & Elsayed, L. (2016). Dental Pulp Stem Cells, a New Era in Regenerative Medicine: A Literature Review. *Open Journal of Stomatology*, 06(06), 155–163. <https://doi.org/10.4236/ojst.2016.66020>

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>

Chen, Y. Y., He, S. T., Yan, F. H., Zhou, P. F., Luo, K., Zhang, Y. D., Xiao, Y., & Lin, M. K. (2016). Dental pulp stem cells express tendon markers under mechanical loading and are a potential cell source for tissue engineering of tendon-like tissue. *International Journal of Oral Science*, 8(4), 213–222. <https://doi.org/10.1038/ijos.2016.33>

Fageeh, H. N. (2021). Preliminary evaluation of proliferation, wound healing properties, osteogenic and chondrogenic potential of dental pulp stem cells obtained from healthy and periodontitis affected teeth. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10082118>

Gioventù, S., & Andriolo, G. (2012). A novel method for banking dental pulp stem cells. July 2014. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2012.06.005>

Gong, P., Tian, Q., He, Y., He, P., Wang, J., Guo, Y., Ye, Q., & Li, M. (2022). Dental pulp stem cell transplantation facilitates neuronal neuroprotection following cerebral ischemic stroke. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113234>

Guo, L., Zou, Z., Smeets, R., Kluwe, L., Hartjen, P., Gosau, M., & Henningsen, A. (2022). Attachment and Osteogenic Potential of Dental Pulp Stem Cells on Non-Thermal Plasma and UV Light Treated Titanium, Zirconia and Modified PEEK Surfaces. *Materials*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/ma15062225>

Jiang, J., Au, M., Lu, K., Eshpeter, A., Korbitt, G., Fisk, G., & Majumdar, A. S. (2007). Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 25(8), 1940–1953. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0761>

Leadbeater, W., Mead, B., Scheven, B. A., Berry, M., & Logan, A. (2016). Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. *Stem Cells*, 35(1), 61–67. <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2398>
file:///Files/8e/8e150b24-e205-4bcd-a93c-21bd0cdf39b.pdf%0Apapers3://publication/doi/10.1002/stem.2398

Masthan, K. M. K., Leena Sankari, S., Aravindha Babu, N., & Gopalakrishnan, T. (2013). Mystery inside the tooth: The dental pulp stem cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(5), 945–947. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5379.2984>

Mohammad El-Sayed Hassouna, Y., Atia Ali El-Bedwehi, A., Atwa Mohamed, A., Abo-Elkhair Mostafa, W., & Abdel-Akher Mohamad Omar, M. (2018). STEM CELLS IN ORTHODONTICS: A REVIEW. In *Journal of Dental Science* (Vol. 21, Issue 5).

Wang, W., Yan, M., Aarabi, G., Peters, U., Freytag, M., Gosau, M., Smeets, R., & Beikler, T. (2022). Cultivation of Cryopreserved Human Dental Pulp Stem Cells – A New Approach to Maintaining Dental Pulp Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911485>

Wright, A., Arthaud-Day, M. L., & Weiss, M. L. (2021). Therapeutic Use of Mesenchymal Stromal Cells: The Need for Inclusive Characterization Guidelines to Accommodate All Tissue Sources and Species. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.632717>

Yasui, T., Mabuchi, Y., Morikawa, S., Onizawa, K., Akazawa, C., & Nakagawa, T. (2017). Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0039-4>

CAPÍTULO 2

ALTERACIÓN EN VIABILIDAD CELULAR, DAÑO EN ADN Y CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE HSP70 EN LEUCOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A RADIACIÓN UVA Y CALOR

Data de submissão: 25/04/2023

Data de aceite: 09/05/2023

David Alejandro García López

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de
Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología
Celular y Neurobiología
Avenida Preparatoria
Colonia Hidráulica, s/n
C.P. 98068, Zacatecas
Zacatecas, México
<https://orcid.org/0000-0003-2064-1959>

Rosa Gabriela Reveles Hernández

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de
Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología
Celular y Neurobiología
Avenida Preparatoria
Colonia Hidráulica, s/n
C.P. 98068, Zacatecas
Zacatecas, México
<https://orcid.org/0000-0003-3109-1606>

Rosa María Ramírez Santoyo

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de
Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología
Celular y Neurobiología
Avenida Preparatoria
Colonia Hidráulica, s/n
C.P. 98068, Zacatecas
Zacatecas, México
<https://orcid.org/0000-0002-0755-9339>

Luz Elena Vidales Rodríguez

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de
Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología
Celular y Neurobiología
Avenida Preparatoria
Colonia Hidráulica, s/n
C.P. 98068, Zacatecas
Zacatecas, México.
<https://orcid.org/0000-0002-4588-7691>

María Argelia López Luna

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de
Ciencias Químicas
Laboratorio de Biología Celular
El Cordobel, Enrique Estrada
C.P. 98068, Zacatecas
Zacatecas, México
<https://orcid.org/0000-0001-8477-5169>

Sergio Hugo Sánchez Rodríguez

Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de
Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología
Celular y Neurobiología
Avenida Preparatoria
Colonia Hidráulica, s/n
C.P. 98068, Zacatecas
Zacatecas, México
<https://orcid.org/0000-0002-7764-7211>

RESUMEN: Las células humanas pueden sufrir estrés por exposición continua a radiación solar, donde la radiación ultravioleta (UV) y el

calor son las que generan mayor daño. La radiación UV se clasifica por su longitud de onda en: UVA, UVB y UVC. La radiación UVA es absorbida por el 70-80% de las células de la dermis. Tanto la UVA y el calor generan estrés oxidativo, afectando proteínas, ADN y lípidos. Así mismo el calor, favorece el envejecimiento, ya que induce la producción de metaloproteinasas y desnaturalización de proteínas. Para mantener la homeostasis, la célula sobre expresa proteína Hsp70, que regula el plegamiento, renaturalización o destrucción de proteínas en formación o dañadas. El objetivo de este proyecto fue determinar el cambio en el número de células vivas, el daño en el ADN y la expresión de Hsp70 en leucocitos humanos expuestos a radiación UVA y calor. Material y métodos: Se aislaron leucocitos de sangre total proveniente de humanos mediante Ficoll Histopaque®, se alicotaron las células y se sometieron a radiación UVA por 0, 1, 2 y 3 horas utilizando una lampara emisora de radiación a 365nm y a calor a 37, 40, 42 y 44 °C durante una hora. Posteriormente se evaluó el número de células vivas por mL, se extrajo su ADN mediante DNAzol® para evaluar su fragmentación en geles de agarosa y se analizó la expresión de Hsp70 mediante PAGE-SDS y Western Blot-ECL. Resultados: Se encontró una disminución significativa en el número de células vivas por mL en los leucocitos expuestos a estrés térmico y radiación UVA. También se observó un aumento en la expresión de Hsp70 por radiación UVA a 1 y 2 horas de exposición, con caída a 3 horas y por calor a 40 y 42 °C, decaendo en 44 °C. Finalmente, se encontró fragmentación del ADN en las muestras expuestas a 2 y 3 horas con radiación UVA y una fragmentación discreta al irradiar 1 hora con radiación UV y a 44 °C. Conclusión. La radiación ultravioleta y el calor generan estrés celular, modifican el número de células vivas, la expresión de Hsp70 y el daño al ADN en leucocitos humanos.

PALABRAS CLAVE: Estrés. Hsp70. Radiación ultravioleta. Leucocitos.

ALTERATION IN CELL VIABILITY, DNA DAMAGE AND CHANGES IN HSP70 EXPRESSION IN HUMAN LEUKOCYTES EXPOSED TO UVA RADIATION AND HEAT

ABSTRACT: Human cells can be stressed by continuous exposure to solar radiation, where ultraviolet (UV) radiation and heat do the most damage. UV radiation is classified by its wavelength into: UVA, UVB and UVC. UVA radiation is absorbed by 70-80% of the cells of the dermis. Both UVA and heat generate oxidative stress, affecting proteins, DNA and lipids. Likewise, heat favors aging, since it induces the production of metalloproteinases and protein denaturation. To maintain homeostasis, the cell overexpresses the Hsp70 protein, which regulates the folding, renaturation, or destruction of forming or damaged proteins. The objective of this project was to determine the change in the number of living cells, DNA damage and Hsp70 expression in human leukocytes exposed to UVA radiation and heat. Material and methods: Leukocytes were isolated from whole blood from humans using Ficoll Histopaque®, the cells were aliquoted and subjected to UVA radiation for 0, 1, 2 and 3 hours using a radiation emitting lamp at 365nm and heat at 37, 40, 42 and 44 °C for one hour. Subsequently, the number of living cells per mL was evaluated, their DNA was extracted using DNAzol® to evaluate their fragmentation in agarose gels, and the expression of Hsp70 was analyzed using PAGE-SDS and Western Blot-ECL. Results: A significant decrease in the number of live cells per mL was found in leukocytes exposed to thermal stress and UVA radiation. An increase in Hsp70 expression was also observed by UVA radiation at 1 and 2

hours of exposure, falling at 3 hours, and by heat at 40 and 42 °C, falling at 44 °C. Finally, DNA fragmentation was found in the samples exposed to 2 and 3 hours with UVA radiation and a discrete fragmentation when irradiated for 1 hour with UV radiation and at 44 °C. Conclusion. Ultraviolet radiation and heat generate cell stress, modify the number of living cells, Hsp70 expression and DNA damage in human leukocytes.

KEYWORDS: Stress. Hsp70. Ultraviolet radiation. Leukocytes.

1 INTRODUCCIÓN

Las células de la piel tanto en humanos como en algunos animales sufren estrés debido a la continua exposición a las emisiones solares. Dentro de estas emisiones, las más destacadas son la radiación UV y el calor.

La radiación UV se clasifica en tres tipos dependiendo de su longitud de onda, siendo: UVA de 320-400nm, UVB de 280-320nm y UVC de 100-280nm (Albanil et al., 2014).

Las emisiones de radiación UV tienen efectos adversos sobre la vida en la tierra. La radiación UVA tiene la capacidad de penetrar la capa de ozono hacia la tierra en un 95% y es absorbida en un 70-80% por las células de la dermis y melanocitos de la epidermis basal en la piel, que está formada por queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, nervios sensoriales, vasos sanguíneos por los que pasan leucocitos y eritrocitos, fibroblastos, mastocitos, linfocitos adheridos a los tejidos, fibroblastos, así como otros componentes (Ferramola y Sancovich, 2006).

Las células de la piel expuestas a dosis prolongadas de radiación UV generan especies reactivas de oxígeno y disminuyen los niveles de enzimas antioxidantes que conducen a procesos oxidativos (Ferramola y Sancovich, 2006). Estos procesos inducen modificaciones en el ADN, lípidos y proteínas y, por tanto, provocan envejecimiento celular, cáncer, procesos inflamatorios, entre otras patologías (Hicks et al., 2006). Se conoce que la radiación UVA penetra hasta la dermis altamente vascularizada, donde interactúa con las células inmunológicas (leucocitos), alterando su función (Morales and López-Nevot 2006; González-Púmariega *et al.* 2009). Por esta razón, utilizamos en el presente proyecto los leucocitos y por su alto grado de radiosensibilidad (Bregues et al., 2017; Lumniczky et al., 2018).

La interacción directa de la radiación UV con el ADN genera una Foto-transformación que incide en el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las cadenas de la molécula, lo que da lugar a la generación de un bucle entre las bases nitrogenadas de una misma cadena de ADN, lo que podría dar lugar también a rupturas de cadena, así como alteraciones en los procesos de replicación y síntesis de proteínas (Carrasco-Ríos, 2009).

Respecto a las proteínas, los fotones UV promueven transiciones electrónicas, lo que afecta el establecimiento de enlaces químicos entre aminoácidos aromáticos, generando oxidaciones inespecíficas de estos, alterando su conformación y funcionalidad proteica (Carrasco-Ríos, 2009).

Cabe hacer mención que durante la exposición a la radiación solar, recibimos dosis de radiación UVA y UVB, además de una carga calórica importante por los rayos infrarrojos. El calor es uno de los grandes estresores sobre los organismos, afecta la desnaturalización de proteínas y otras moléculas, aumenta la producción de radicales libres y de metaloproteinasas que degradan componentes de matriz extracelular principalmente colágeno generando envejecimiento prematuro en la piel (Pérez-García, 2004; Cho et al., 2009).

Durante diversos procesos de estrés como choque térmico, exposición a metales pesados, especies reactivas de oxígeno, radiación ultravioleta, entre otros, existe un grupo de proteínas que se sobre expresan para recuperar la homeostasis celular al renaturalizar proteínas o al inducir su destrucción cuando son dañadas (Sarkar and Roy, 2017). Este grupo de proteínas se les conoce como de estrés térmico (Hsp). Son una familia de proteínas altamente conservadas a través de la evolución y existen tanto en células eucariontes como procariontes. En condiciones normales ayudan al plegamiento de proteínas, en los procesos de transporte a través de membranas, así como a su integración a diversos organelos. Una familia de Hsp importante es la Hsp70 la cual actúan como chaperonas y juegan un rol importante en la homeostasis de proteínas en la célula (Shacoski, 2012). En condiciones normales la proteína Hsp70 ayudan al plegamiento de proteínas en condiciones normales, en procesos de transporte a través de membranas, así como a su integración a diferentes orgánulos, y durante el estrés pueden renaturalizar proteínas dañadas o inducir las a su destrucción cuando el daño es catastrófico, lo que aumenta considerablemente la tolerancia celular al estrés (Shacoski, 2012).

Por lo antes expuesto, es de capital importancia entender como la radiación UVA y el calor afectan la supervivencia celular debido al estrés que producen. El objetivo de presente estudio fue determinar el cambio en el número de células vivas, el daño en el ADN y la expresión de Hsp70 en leucocitos humanos expuestos a radiación UVA y calor.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MODELO DE ESTUDIO

Se utilizaron leucocitos Humanos, los cuales fueron seleccionados por su alto grado de sensibilidad a las radiaciones tanto ionizantes como no ionizantes y por su fácil obtención (Shidham & Swami, 2000; Brengue *et al.*, 2017; Lumniczky *et al.*, 2018).

Las muestras sanguíneas fueron de voluntarios sanos con una edad de 20-30 años, se colectaron por punción en la vena cefálica utilizando tubos Vacutainer® con EDTA (n = 5).

2.2 OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS

Se llevó a cabo por gradiente de Ficoll Histopaque® (SIGMA-ALDRICH® 10771). Hecho esto, se procedió a realizar alícuotas de 500 µL de los leucocitos en medio RPMI® (con un promedio de 100,000 células) en tubos eppendorf para exponerlos a radiación UVA.

2.3 EXPOSICIÓN A RADIACIÓN UVA

Los leucocitos fueron expuestos a radiación UVA en los tiempos: 1, 2 y 3 horas utilizando una lámpara de radiación UV Handelheld® con un potencial de exposición de radiación UVA de 8W a 365nm. Como control se utilizaron leucocitos no irradiados (0 horas).

2.4 NÚMERO DE CÉLULAS VIVAS

Se realizó un conteo de células vivas por cada mililitro de solución mediante conteo en cámara de Neubauer y utilizando el método de exclusión de azul de tripán (Strober, 2001). Todo lo anterior fue una hora después de la irradiación.

2.5 LISIS CELULAR

Cada muestra de leucocitos fue homogenizada en tubos Eppendorf con 500 µL de buffer de lisis (Tritón X-100 al 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6) con inhibidor de proteasas 1 mM, PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, P-7626), realizando inversiones sucesivas. El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 10,976 gravedades y el sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de proteínas. La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford (1976), para garantizar que se evaluará la misma cantidad de proteína de cada muestra por PAGE-SDS.

2.6 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR PAGE-SDS

De cada condición experimental, 20 µg de proteína fueron caracterizadas por PAGE-SDS al 7.5% de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli en 1970 (He, 2011).

2.7 WESTERN BLOT E INMUNODETECCIÓN

Las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham, RPN303C), tal como describió Towbin en 1979. Las membranas fueron bloqueadas con PBS-Caseína al 3% durante toda la noche, después, se lavaron con PBS e incubaron con anticuerpos monoclonales para identificar Hsp70 (SC-24 Santa Cruz Biotechnology®) en dilución 1:1000 en solución bloqueadora, por 1 hora. Posteriormente para identificar la unión del primer anticuerpo a la proteína de interés, las membranas se incubaron con un segundo anticuerpo anti-ratón IgG-HRP conjugado a peroxidasa (SC-2005 Lot.F0412 Santa Cruz Biotechnology®). La unión antígeno-anticuerpo fue observada mediante colorimetría empleando Diaminobencidina (0.1%) activada con peróxido de hidrógeno, observando la aparición de bandas de color café, las cuales se analizaron con un foto-documentador marca Bio-Rad® (Image Lab Bio-Rad® Laboratorios) empleando el software Image Lab versión 2.0.1 build 18 (Copyright© 2009 de Bio-Rad® Laboratories), para obtener su densidad óptica con la finalidad de cuantificar el nivel de expresión de Hsp70 en cada muestra.

2.8 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ADN

Para el aislamiento de ADN genómico, se tomó una alícuota de 500 µL de cada muestra al cual se le adiciono reactivo DNAzol® (Regent GibcoBRL) para lisar. Después, el ADN genómico se precipito mediante etanol absoluto frio. Tras un lavado con etanol (75%), el ADN se disolvió en NaOH 8 mM para ser re-suspendido. Posteriormente el ADN se cuantificó por espectrofotometría (a 260 nm) utilizando un Nanodrop® (thermo scientific), para garantizar la misma concentración de ADN de cada muestra, posteriormente se realizó el corrimiento del ADN en geles de agarosa y se evaluó su integridad.

El ADN se caracterizó en geles de agarosa (0.8%) en buffer TAE 1X (Tris ácido etilendiamin tetracético, 5 M, pH 8) con bromuro de etidio para revelarse, preparando las muestras con buffer de carga y colocándose en el gel junto con un marcador de peso molecular para correrse a 80 Volts por una hora, posteriormente se observaron los geles en el foto-documentador Bio-Rad® (descrito anteriormente) para evaluar su integridad.

La integridad o degradación del ADN se observó en el gel de agarosa utilizando el siguiente criterio: Si el ADN esta integro, se observa una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (Cornejo *et al.*, 2014).

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado, los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas Microsoft Excel® y GraphPad Prism 8.0.1®. Respecto al número de células vivas por mililitro, primero se normalizaron los datos respecto al valor de cada control, posteriormente se evaluó las diferencias entre los grupos experimentales mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de pruebas T, donde se compararon los grupos experimentales respecto a sus controles.

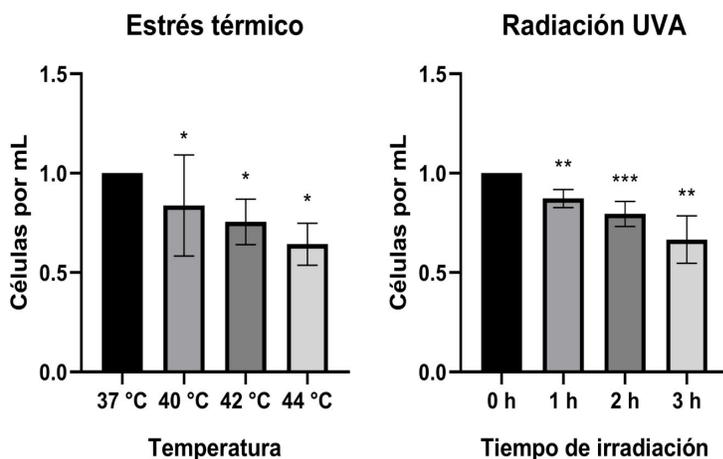
Los gráficos que comparan las diferencias entre los grupos experimentales fueron diseñados mediante GraphPad Prism 8.0.1®, y expresados como media \pm error estándar, considerándose estadísticamente significativos valores de $p \leq 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 NÚMERO DE LEUCOCITOS VIVOS EXPUESTOS A ESTRÉS TÉRMICO Y RADIACIÓN UVA

Se evaluó el número de leucocitos vivos expuestos a estrés térmico y radiación UVA, encontrándose para estrés térmico, una caída progresiva en las medias celulares respecto al control a los 40, 42 y 44°C. De igual manera respecto a la exposición a radiación UVA, se observó una caída progresiva en las medias celulares a la 1, 2 y 3 horas con radiación UVA (**figura 1**).

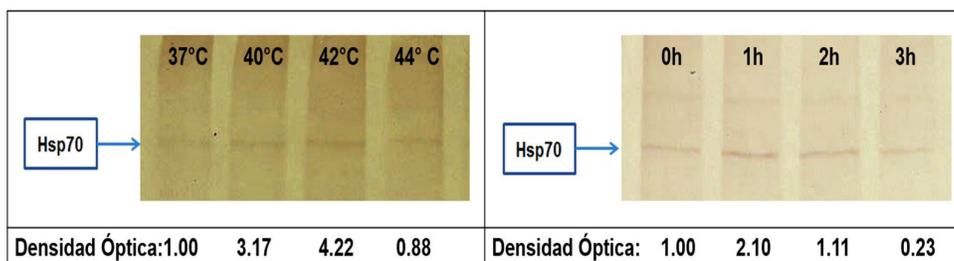
Figura 1. Medias \pm error estándar del número de leucocitos vivos al ser expuestos a estrés térmico y radiación UVA.



3.2 EXPRESIÓN DE HSP70 EN LEUCOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A ESTRÉS TÉRMICO Y RADIACIÓN UVA

Al analizar la expresión de Hsp70, se observó un aumento en las densidades ópticas por la expresión de esta proteína en estrés térmico a 40 y 42, decayendo a lo 44°C y por radiación UVA a la 1 y 2 hora de irradiación, decayendo a las 3 (figura 2).

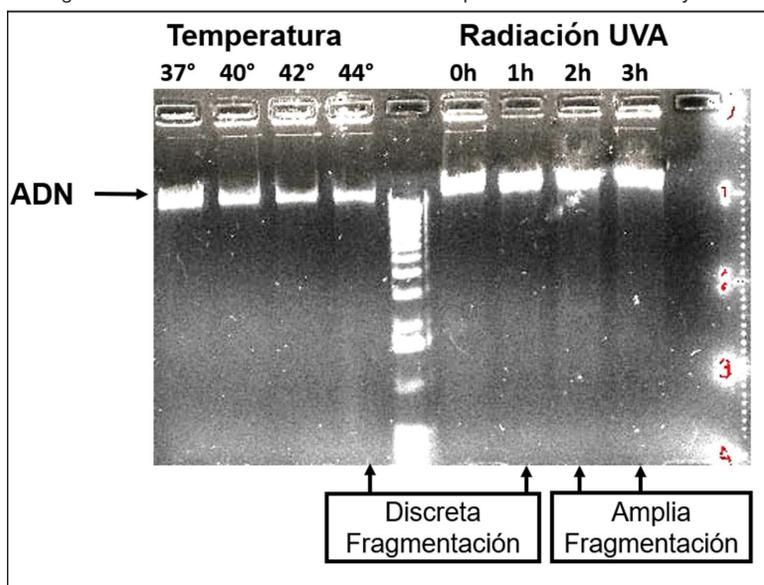
Figura 2. Densidad óptica de la expresión de Hsp70 en leucocitos humanos expuestos a estrés térmico y radiación UVA.



3.3 FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LEUCOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A ESTRÉS TÉRMICO Y RADIACIÓN UVA

Al analizar el daño al ADN por estrés térmico y radiación UVA, se observaron fragmentaciones amplias en las muestras expuestas a 2 y 3 horas de con radiación UVA, así como una fragmentación muy discreta en las muestras expuestas a 1 hora de radiación UVA y a 44 °C (figura 3).

Figura 3. Fragmentación de ADN en leucocitos humanos expuestos a estrés térmico y Radiación UVA.



4 DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio fue determinar el cambio en el número de células vivas, el daño en el ADN y la expresión de Hsp70 en leucocitos humanos expuestos a radiación UVA y estrés térmico.

Al analizar el número de leucocitos humanos vivos sometidos a radiación UVA y a estrés térmico, las poblaciones celulares disminuyeron conforme aumento el tiempo y temperatura de exposición, lo cual infiere muerte celular por la exposición a estos factores, coincidiendo con los registros de otros autores e incluso utilizando modelos tanto animales como vegetales (Carrasco-Ríos, 2009; Sayed et al., 2018), se cree que esta muerte celular por la exposición a radiación UV puede producirse mediante apoptosis, ya que varios autores reportan este fenómeno tanto en células mononucleares de sangre periférica humana, como en células Jurkat y leucocitos de ratas tratadas con radiación UVA por medio de fotoféresis (Yoo *et al.*, 1996; Wolnicka-Głubisz *et al.*, 2002), así como en neutrófilos irradiados con radiación UVB (Grbatinić & Milošević, 2016). Por otro lado cuando sometimos a calor los leucocitos, se observó una discreta pero significativa disminución de células vivas. El calor genera estrés celular, que de acuerdo a Pérez-García (2004) y Cho et al., (2009) induce la generación de radicales libres y metaloproteinasas que conducen a un envejecimiento celular prematuro y una posible muerte celular.

Al observar el comportamiento en la expresión de Hsp70 que es un bioindicador de estrés celular (Mayer, 2013; Multhoff et al., 2015), encontramos un incremento de esta proteína por exposición a radiación UVA a la una y dos horas y un decaimiento a las tres horas, esta última indicándonos que la célula no estaba respondiendo porque posiblemente se activó un proceso de muerte. Estos resultados coinciden con otros estudios en diferentes modelos experimentales sometidos con luz UV como en células epidérmicas (NHK, células A431, NHM y SK30) que mostraron una expresión de Hsp70 alta y no más regulación después de la irradiación con UVA (Roh et al., 2008); así mismo se ha observado en corneas de ratón sometidas a radiación UVB una elevación en la proteína Hsp70 (Lennikov et al., 2013); otro estudio en queratinocitos de ratones transgénicos irradiados con UVB, se observó un aumento en la expresión de Hsp70 y una disminución de esta en las dosis mayores (Matsuda et al., 2010); al igual que para embriones de erizo (*Paracentrotus lividus*) expuestos a luz UVB presentaron una elevación en la proteína Hsp70 (Bonaventura et al., 2006).

Al evaluar la fragmentación al ADN, se encontró que dicho material se degradaba en mayor medida por la exposición a radiación UV, siendo más evidente conforme aumentó

el tiempo de irradiación, este daño al ADN por UVA coincide con reportes de Martínez *et al* (2017), en donde se demostró la existencia de varios mecanismos que dañan al ADN por la exposición a radiación UVA, así también por lo reportado por Sayed (2018), el cual observó que al irradiar células sanguíneas de *Clarias gariepinus* con radiación UVA, se inducía daño al ADN, el cual se incrementa al aumentar la dosis de exposición.

5 CONCLUSIÓN

La radiación ultravioleta y el calor generan estrés celular al alterar el número de células vivas, la expresión de Hsp70 y al generar daño en el ADN en los leucocitos humanos.

REFERENCIAS

Albanil Encarnación Adelina, Pascual Ramírez Reynaldo, Bello Jiménez Brenda. Reporte del Clima en México [en línea] 2014 Enero [fecha de acceso 26 de Febrero de 2018];1(1):[apx20p] disponible en <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/analisis/reporte/Anual2014.pdf>.

Bonaventura, R., Poma, V., Russo, R., Zito, F. & Matranga, V. (2006). Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology*, 149, 79-86.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1):248-54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

Bregues M, Lapierre A, Bourcier C, Pèlerin A, Özsahin M, Azria D. (2017). T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(2):119-127. doi: 10.1080/14737159.2017.1271715.

Bregues M, Lapierre A, Bourcier C, Pèlerin A, Özsahin M, Azria D. (2017). T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(2):119-127. doi: 10.1080/14737159.2017.1271715.

Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. *IDESIA*, 27 (3): 59-70.

Cho, S., Shin, M. H., Kim, Y. K., Seo, J.-E., Lee, Y. M., Park, C.-H., & Chung, J. H. (2009). Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, 14(1), 15-19.

Cornejo A, Serrato B, Rendón MG. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Primera ed. Mexico: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 251. ISBN: 978-607-8246-72-4.

Ferramola SAM y Sancovich HA. (2006). Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas de oxígeno sobre la piel. *Rev Argent Dermatol*, 87: 113-120.

González-Púmariega M.; Tamayo MV.; Sánchez-Lamar Á. (2009). La radiación ultravioleta. su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Ultraviolet radiation and its incidence in the human health*, 18(2):69-80.

Grbatinić I, Milošević NT. (2016). Incipient UV-Induced Structural Changes in Neutrophil Granulocytes: Morphometric and Texture Analysis of Two-Dimensional Digital Images. *Microscopy and Microanalysis*, 22(2):387-93. DOI:10.1017/S1431927616000532.

He F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol*, e80-e80. doi: 10.21769/BioProtoc.80.

Hicks JJ, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas MP. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14(4): 223-226.

Lennikov, A., Kitaichi, N., Kase, S., Noda, K., Horie, Y., Nakai, A., Ohno, S. & Ishida, S. (2013). Induction of heat shock protein 70 ameliorates ultraviolet-induced photokeratitis in mice. *International journal of molecular sciences*, 14, 2175-2189.

Lumniczky K, Candéias SM, Gaipf US, Frey B. (2018). Radiation and the Immune System: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 8,1933. doi:10.3389/fimmu.2017.01933.

Lumniczky K, Candéias SM, Gaipf US, Frey B. (2018). Radiation and the Immune System: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 8,1933. doi: 10.3389/fimmu.2017.01933.

Martinez-Fernandez L, Banyasz A, Esposito L, Markovitsi D, Improtta R. (2017). UV-induced damage to DNA: effect of cytosine methylation on pyrimidine dimerization. *Signal Transduct Target Therapy*, 2(1):1-7. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.21.

Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K.-I., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. & Mizushima, T. (2010). Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *The Journal of biological chemistry*, 285, 5848-5858.

Mayer MP. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(10):507- 14. doi: 10.1016/j.tibs.2013.08.001.

Morales CM.; López-Nevot MA. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*, 29:25-32.

Multhoff G, Pockley AG, Schmid TE, Schilling D. (2015). The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Letters*, 368(2):179-184. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.013.

Pérez-García, LJ. (2004). Metaloproteínas y Piel. *Acatas. Dermo-Sifiliográficas*, 95;7:413-426.

Roh, B. H., Kim, D. H., Cho, M. K., Park, Y. L. & Whang, K. U. (2008). Expression of Heat Shock Protein 70 in Human Skin Cells as a Photoprotective Function after UV Exposure. *Annals of dermatology*, 20, 184-189.

Sarkar, S. & Roy, S. (2017). A mini review on heat shock proteins (HSPs): special emphasis on heat shock protein70 (HSP70). *BN Seal Journal of Science*, 9;1: 130-9.

Sayed AE-DH. (2018). UVA-Induced DNA Damage and Apoptosis in Red Blood Cells of the African Catfish *Clarias gariepinus*. *Photochemistry and Photobiology*, 94(1):158-64. DOI: 10.1111/php.12818.

Shacoski, J.C. (2012). Proteínas de choque térmico como marcadores de estrés celular en espermatozoides de mamíferos (Tesis Doctoral). Proquest LLC. Universidad de Davis California. UE.

Shidham VB, Swami VK. (2000). Evaluation of Apoptotic Leukocytes in Peripheral Blood Smears. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 124(9):1291-1294. DOI: 10.5858/2000-124-1291-EOALIP.

Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* Appendix 3: Appendix 3B. doi:<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9):4350-354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.

Wolnicka-Głubisz A, Rijnkels JM, Sarna T, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. (2002). Apoptosis in leukocytes induced by UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, chlorpromazine or 4,6,4'-trimethylangelicin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 68(2):65-72. doi: 10.1016/s1011-1344(02)00332-9.

Yoo E, Rook A, Elenitsas R, Gasparro F, Vowels B. (1996). Apoptosis Induction by Ultraviolet Light A and Photochemotherapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Relevance to Mechanism of Therapeutic Action. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(2):235-242. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12329711.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS DE *Citrus aurantifolia* X *Citrus limon* UTILIZANDO MARCADORES DE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (SSR)¹

Data de submissão: 30/03/2023

Data de aceite: 18/04/2023

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Tecomán
Laboratorio de Biotecnología
Tecomán, Colima, México
ORCID: 0000-0003-1949-1922

Mario Orozco Santos

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Tecomán
Laboratorio de Fitopatología
Tecomán, Colima, México
ORCID: 0000-0002-9451-2626

Claudia Yared Michel López

Universidad Autónoma de Baja California (UABC)
Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA)
Ejido Nuevo León, Mexicali
Baja California, México
ORCID: 0000-0002-3595-1768

Paola Andrea Palmeros Suárez

Departamento de Producción Agrícola
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA)
Universidad de Guadalajara
Zapopan, Jalisco, México
ORCID: 0000-0002-5629-5990

Mayra Guadalupe Mena Enriquez

Centro de Investigación Multidisciplinario en Salud
Centro Universitario de Tonalá
Universidad de Guadalajara,
Tonalá, Jalisco, México
ORCID: 0000-0002-7241-7847

RESUMEN: La apomixis es un tipo de reproducción asexual donde la formación de semillas porta embriones genéticamente idénticos al progenitor, constituyendo un obstáculo en programas de mejoramiento genético de muchas especies vegetales, incluyendo cítricos. La identificación de plantas híbridas se realiza mediante caracteres morfológicos, ensayos isoenzimáticos y marcadores moleculares. Estos últimos se han utilizado con mayor frecuencia debido a su precisión, destacando el uso del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, “Random Amplified Polymorphic DNA”) y Secuencias Simples Repetidas (SSR, “Simple Sequence Repeats”). En limón mexicano (*C. aurantifolia*) únicamente se han utilizado

¹ Esta información corresponde a un trabajo publicado previamente en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas y fue generada con el proyecto de investigación titulado “Generación de híbridos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con mayor tolerancia al huanglongbing”, el cual fue financiado por recursos fiscales del INIFAP. La información adicional para esta publicación incluye un apartado de perspectivas del trabajo.

marcadores RAPD para la identificación de híbridos, por lo que no existen reportes que hagan uso de marcadores SSR para este fin. El objetivo del presente trabajo fue identificar híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* var. “Colimex” X *C. limon* var. “Rosenberg” y su recíproca utilizando marcadores moleculares SSR. Durante el año 2014-2016 se colectaron hojas de árboles de limón de aproximadamente 12 meses de edad. Se evaluaron en total ocho marcadores moleculares SSR sobre los progenitores utilizados en este estudio y fueron seleccionados los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 para la identificación de híbridos en las dos poblaciones progenie. De un total de 40 y 43 individuos F1 procedentes de la cruce bidireccional entre “Colimex” X “Rosenberg”, se lograron identificar 17 y 35 plantas híbridas, respectivamente. Los resultados indican que los marcadores SSR son eficientes y confiables para la identificación de híbridos de limón mexicano.

PALABRAS CLAVE: Apomixis. Cítricos. Marcadores moleculares. Microsatélites.

IDENTIFYING HYBRIDS OF *Citrus aurantifolia* X *Citrus limon* USING SIMPLE SEQUENCE REPEATS (SSR) MARKERS

ABSTRACT: Apomixis is a type of asexual reproduction where the seeds formation carries genetically identical embryos to the parent, constituting an obstacle in breeding programs for many plant species, including citrus. The identification of hybrid plants is carried out by morphological characters, isoenzymatic assays and molecular markers. The latter have been used more frequently because of their accuracy, standing out the use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeats (SSR). In Mexican lime (*C. aurantifolia*) RAPD markers have only been used for hybrid identification, so there are no reports that use SSR markers for this purpose. The aim of this paper was to identify hybrids derived from controlled pollination between *C. aurantifolia* var. “Colimex” x *C. limon* var. “Rosenberg” and its reciprocal using SSR molecular markers. During the 2014-2016 years, leaves of lime trees of approximately 12 months of age were collected. A total of eight SSR molecular markers were evaluated on the progenitors used in this study and the TAA45 and cAGG09 oligonucleotides were selected for the hybrids identification in the two progeny populations. From a total of 40 and 43 F1 individuals from the bi-directional cross between “Colimex” x “Rosenberg”, 17 and 35 hybrid plants were identified, respectively. The results indicate that SSR markers are efficient and reliable for the identification of Mexican lime hybrids.

KEYWORDS: Apomixis. Citrus. Microsatellites. Molecular markers.

1 INTRODUCCIÓN

Los cítricos se desarrollan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En México, la agroindustria cítrica representa una de las más importantes, generando una derrama económica superior a los 375 millones de dólares (SIAP, 2016). El mejoramiento genético de este cultivo constituye una actividad rutinaria que se lleva a cabo en varios países con el objetivo de mejorar la calidad de la fruta o conseguir tolerancia a estrés biótico y/o abiótico (Tozlu et al., 1999; Mendoza-Rodríguez et al., 2001;

Machado et al., 2011; Omura y Shimada, 2016). Las especies del género *Citrus* presentan poliembriónia y apomixis, que generan alteraciones en el proceso de reproducción sexual entre organismos vegetales, en el que múltiples embriones se encuentran en una semilla o donde varios embriones derivados del progenitor receptor del polen se originan del tejido nucelar que rodea al embrión cigótico (Koltunow et al., 1996; Kepiro y Roose 2007). La mayoría de los cítricos comerciales de todo el mundo se propagan como árboles injertados con la variedad de interés en un portainjerto (Wutscher y Hill, 1995; Khan y Kender, 2007). La mayor parte de estos portainjertos son apomícticos, por lo que si se requiere mantener la homogeneidad genética puede resultar ventajosa esta condición como un proceso de multiplicación clonal. De esta forma, se pueden producir plantas uniformes a partir de semillas a bajo costo. Por otra parte, cuando es deseable generar variabilidad mediante recombinación genética para la obtención de híbridos, con resistencia a enfermedades, por ejemplo, entonces la apomixis representa un obstáculo, ya que las plantas resultan genéticamente idénticas al progenitor receptor del polen (Khan y Kender, 2007). Para la identificación de plantas cigóticas en cítricos, se han utilizado marcadores fenotípicos, los cuales se basan principalmente en la morfología de las hojas. Por otra parte, los ensayos isoenzimáticos y el empleo de la citometría de flujo también se han utilizado como herramientas para realizar este tipo de análisis (Anderson et al., 1991; Ruiz et al., 2000; Viloria et al., 2005), sin embargo, estas técnicas pueden presentar algunas limitaciones. En la actualidad, el uso de la biología molecular ha permitido ampliar las herramientas utilizadas para la identificación genética de especies vegetales mediante el uso de marcadores moleculares, entre los cuales destacan los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) y SSR (Simple Sequence Repeat) por sus siglas en inglés (Bastianel et al., 1998; Golein et al., 2011; Yildiz et al., 2013; Mondal y Saha, 2014; Mondal et al., 2015).

En Turquía se ha reportado el uso eficiente de los oligonucleótidos AG14 y TAA03 de marcadores SSR para identificar y eliminar individuos nucleares en poblaciones de híbridos, resultado de cruzamientos entre variedades de mandarinas (*C. reticulata*), naranjas (*C. sinensis*) y toronjas (*C. paradisi*) (Yildiz et al., 2013). Recientemente en la India se han empleado cuatro oligonucleótidos SSR con repeticiones AG: CCSM13, CCSM17, CCSM18 y CCSM147 para identificar plantas cigóticas y nucleares en una población de *C. reticulata* (Mondal et al., 2015). En México, las especies de *C. macrophylla* y *C. volkameriana* son comúnmente utilizadas como portainjertos para la propagación y establecimiento de árboles de limón mexicano. En el año 2004, Andrade-Rodríguez et al. (2004), realizaron un estudio para determinar el origen cigótico o nucelar en *C.*

volkameriana utilizando marcadores RAPD, obteniéndose resultados satisfactorios. De la misma manera, en el caso del limón mexicano (*C. aurantifolia*), se han utilizado exitosamente marcadores RAPD, destacando el uso del decámero OPH15 (Mondal y Saha, 2014); sin que existan reportes en los que se haya empleado otro tipo de marcadores moleculares, como los SSR.

En el programa de mejoramiento genético del INIFAP, se realizan rutinariamente cruza entre limones mexicanos (*C. aurantifolia*) y limones italianos (*C. limon*), ya que se ha observado que la progenie presenta cierta tolerancia a la enfermedad bacteriana del HLB (Huanglongbing o enfermedad del dragón amarillo), la cual ocasiona uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan la productividad en la región del Pacífico de México. A pesar de que existen muchos reportes para la identificación de plantas cigóticas en cítricos utilizando marcadores moleculares, en México no se han reportado estudios utilizando marcadores SSR para identificar plantas híbridas de *C. aurantifolia*. Con el objetivo de establecer las variaciones en los híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* var. “Colimex” X *C. limon* var. “Rosenberg” y su recíproca, se realizó el presente trabajo con el uso de marcadores SSR.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Se colectaron hojas con apariencia sana de árboles de limón de dos poblaciones progenie para identificar individuos de origen cigótico y confirmar la condición híbrida de las plantas. La cruza *C. aurantifolia* (♀) X *C. limon* (♂) consistió de 40 individuos, mientras que la cruza *C. limon* (♀) X *C. aurantifolia* (♂) la constituyeron 43 individuos. El muestreo se realizó en árboles de 12 meses de edad, establecidos en campo dentro del programa de mejoramiento genético de limón mexicano del INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México, ubicado a 60 msnm.

2.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Se utilizó el método descrito por Bermúdez-Guzmán et al., 2016 con algunas modificaciones. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4 °C y 13,500 rpm. Las hojas de las plantas muestreadas se lavaron con agua y jabón corrientes. Enseguida se pesaron aproximadamente 100-200 mg de tejido foliar y se pulverizaron en un mortero conteniendo nitrógeno líquido y homogeneizados con 1 mL de solución amortiguadora CTAB [100 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA pH 8, 1.4 M de NaCl, 3% (p/v) de CTAB y 1% (p/v) de PVP]. Posteriormente se adicionaron 10 µL de 2-β-mercaptoetanol concentrado

y 5 μL de proteína K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron durante 45 min a 65 °C en baño maría, se mezclaron por inversión cada 5-10 minutos, después se centrifugaron durante tres minutos. La fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo y se agregó 5 μL de RNasa A 10 mg/mL (Sigma Aldrich) a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó un volumen de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente usando un vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos. El sobrenadante recuperado se colocó en tubos de 1.5 mL y el DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el DNA se lavó con 500 μL de etanol al 70%; los tubos se centrifugaron durante 2 minutos, la fase acuosa se decantó y se invirtieron los tubos sobre papel absorbente para retirar el exceso de etanol. Los DNA se secaron a temperatura ambiente, resuspendidos en 80 μL de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH,8) y finalmente, almacenados a -20 °C. 200 mg de tejido foliar fueron pulverizados con nitrógeno líquido hasta.

2.3 CUANTIFICACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO

La concentración del DNA (ng/ μL) se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific). La pureza se midió considerando las relaciones de A260:280 y A260:230. La integridad de los ácidos nucleicos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma Aldrich) al 1% cargando 5 μL de DNA genómico de cada muestra. El gel se tiñó con Bromuro de etidio 10 mg/mL (Sigma Aldrich) y se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador (UVP).

2.4 ANÁLISIS DE MARCADORES SSR

Los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* se analizaron con ocho juegos de oligonucleótidos descritos por Kijas et al., (1997) (Tabla 1) para identificar aquellos que generan polimorfismos diferenciales en ambas especies. Los oligonucleótidos seleccionados se utilizaron para analizar las dos poblaciones progenie de *C. aurantifolia* X *C. limon* y su recíproca. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 15 μL conteniendo 7.5 μL de REDTaq ReadyMix™ (Sigma Aldrich), 5 μL de DNA genómico (20 ng/ μL), 1 μL de cada oligonucleótido y 0.5 μL agua grado molecular. Las condiciones de amplificación para la PCR se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene Labnet y fueron las descritas por Kijas et al., (1997) con algunas modificaciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. La extensión final fue de 72 °C por 10 min.

Se utilizó la electroforesis vertical en gel de poli(acrilamida) bajo condiciones no desnaturizantes utilizando el sistema de dobles geles "PerfectBlue" (PeQlab). Se cargó 1 µL de marcador de peso molecular de 25 y 50 pares de bases (pb) (Bioline) y 3 µL del producto de PCR de cada muestra. Los geles se prepararon en un volumen de 30 mL conteniendo acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 6%, amortiguador TBE 1 X, 140 µL de APS al 25%, 35 µL de TEMED y agua destilada estéril, después se corrieron a 200 V durante 50 minutos. Finalmente se tiñeron con solución de plata de acuerdo Sanguinetti et al., (1994) con algunas modificaciones: 10 minutos en solución fijadora (10% de etanol y 0.5% de ácido acético), 1 enjuague con agua destilada, 10 minutos en solución de tinción (0.2% de AgNO₃), 1 enjuague con agua destilada, 10-15 minutos en solución reveladora (3% de NaOH y 0.5% de formaldehído) y un último enjuague con agua destilada. Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz blanca para su análisis.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron ocho oligonucleótidos para detectar bandas diferenciales en los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* utilizados en el presente estudio (Tabla 1). Los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 se seleccionaron debido a que permitieron la amplificación de bandas polimórficas de fácil interpretación; cuatro de los oligonucleótidos amplificaron mayormente bandas monomórficas no informativas y de baja resolución, por lo que no se utilizaron para la detección de híbridos en las poblaciones analizadas. El iniciador TAA41 generó bandas muy difusas que no se registraron. Por otra parte, el cebador TAA52 no permitió la amplificación de algún segmento de DNA en las muestras analizadas (Figura 1).

Los oligonucleótidos de la serie TAA descritos por Kijas et al. (1997) se han utilizado ampliamente en la detección de híbridos entre cruzamientos de varias especies de cítricos como toronja (*C. paradisi*), naranjo trifoliado (*C. trifoliata*), naranjo dulce (*C. sinensis*) y mandarina (*C. reticulata*) (Ruiz et al., 2000; Ahmad et al., 2012; Yildiz et al., 2013; Mondal et al., 2015). Sin embargo, no hay reportes de su uso en limón mexicano (*C. aurantifolia*) y limón italiano (*C. limon*), por lo que estos resultados constituyen el primer reporte en estas especies para determinar su potencial como detectores de híbridos en los programas de mejoramiento genético.

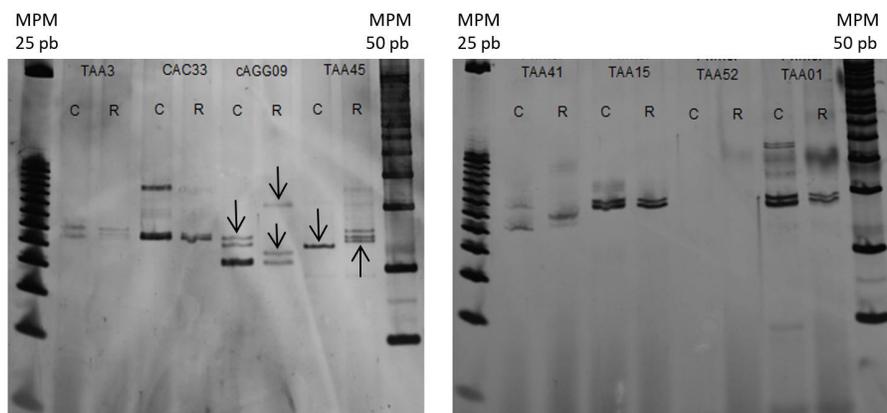
En las poblaciones de 40 y 43 individuos procedentes de las cruces de *C. aurantifolia* var. "Colimex" X *C. limon* var. "Rosenberg" y su recíproca, respectivamente, se lograron detectar un total de 52 híbridos con los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 (Tabla 2). El marcador TAA45 amplificó dos alelos polimórficos, uno presente en "Colimex"

y ausente en “Rosenberg” de aproximadamente 100 pb y otro presente en “Rosenberg” y ausente en “Colimex” de 110 pb. Este último fragmento en algunos geles se visualizó como una única banda, sin embargo, se trataba de 3 bandas polimórficas con pesos moleculares muy similares, por lo que en ocasiones no alcanzaban a separarse. En la figura 2 A se observan los híbridos detectados con el marcador TAA45 (722, 724, 736, 742 y 828), el cual también amplificó otras bandas polimórficas que no se tomaron en cuenta para la identificación de híbridos debido a su baja resolución.

Tabla 1. Oligonucleótidos SSR utilizados para detectar polimorfismos en *C. aurantifolia* y *C. limon*.

No.	Nombre del oligonucleótido	Secuencias (5'-3')	Total de amplicones	Bandas polimórficas
1	TAA3	F-AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC R-GAGATGGGACTTGGTTCATCACG	4	0
2	CAC33	F-GGTGATGCTGCTACTGATGC R-CAATTGTGAATTTGTGATTCCG	4	0
3	cAGG09	F-AATGCTGAAGATAATCCGCG R-TGCCTTGCTCTCCACTCC	6	4
4	TAA45	F-GCACCTTTTATACCTGACTCGG R-TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG	9	5
5	TAA41	F-AGGTCTACATTGGCATTGTC R-ACATGCAGTGCTATAATGAATG	-	-
6	TAA15	F-GAAAGGGTTACTTGACCAGGC R-CTTCCCAGCTGCACAAGC	4	0
7	TAA52	F-GATCTTGACTGAACTTAAAG R-ATGTATTGTGTTGATAACG	0	0
8	TAA01	F-GACAACATCAACAACAGCAAGAGC R-AAGAAGAAGAGCCCCCATTAGC	6	2

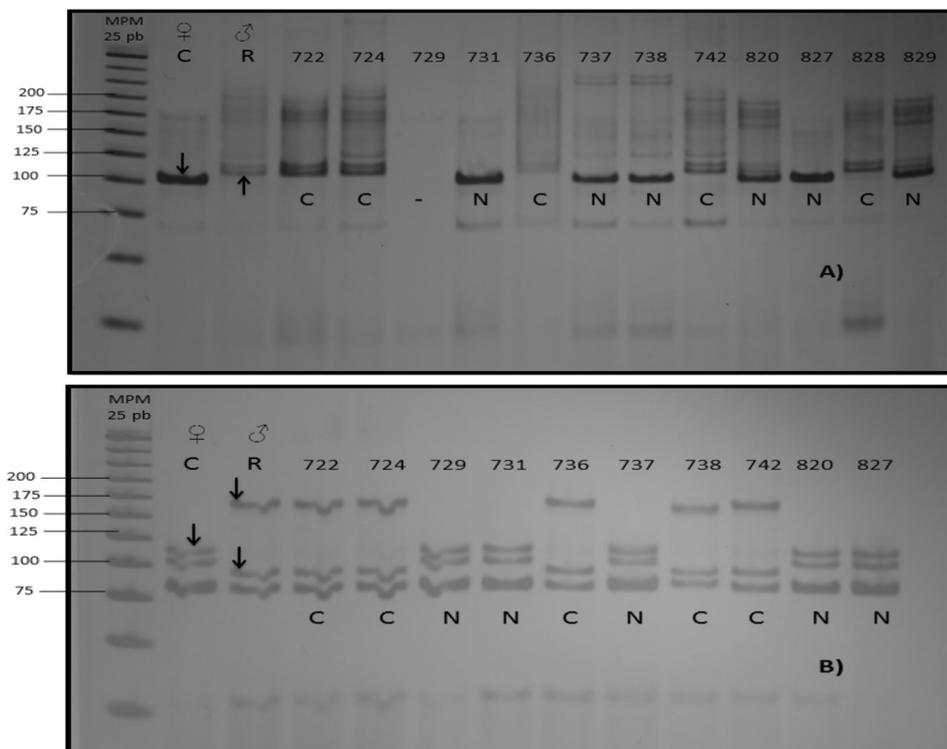
Figura 1. Evaluación de oligonucleótidos de marcadores SSR a partir de DNA de progenitores. C: *Citrus aurantifolia* var. “Colimex”. R: *Citrus limon* var. “Rosenberg”. MPM: Marcador de Peso Molecular 25 y 50 pb (Bioline).



El iniciador cAGG09 amplificó cuatro bandas polimórficas en las poblaciones analizadas, con pesos moleculares aproximados de 90, 100, 110 y 170 pb. En ambas poblaciones, con este marcador, se amplificó una banda monomórfica de 80 pb no informativa. Los híbridos de “Colimex” se identificaron por los alelos de 90 y 170 pb (Figura 2 B, carriles 722, 724, 736, 738 y 742), los cuales están presentes en “Rosenberg” (donador del polen) y ausentes en “Colimex” (receptor del polen).

De manera similar, los híbridos de “Rosenberg” se identificaron por los alelos de 105 y 115 pb, los cuales están presentes en “Rosenberg” y ausentes en “Colimex”. En este sentido, se considera que un híbrido puede ser determinado identificando un solo locus codominante para el cual los progenitores no comparten alelos, es decir, cruza de la configuración aa x bb, ab x cc o ab x cd. También se pueden usar marcadores dominantes, como RAPD e ISSR, si el progenitor receptor del polen es 00 (banda ausente) y el donador del polen es 11 (banda homocigótica presente) (Kepiro y Roose, 2007).

Figura 2. Perfiles electroforéticos obtenidos con los oligonucleótidos TAA45 (A) y cAGG09 (B). MPM: Marcador de Peso Molecular 25 pb (Bioline). ♀: Planta receptora de polen. ♂: Planta donadora de polen. C: *C. aurantifolia* var. “Colimex”. R: *C. limon* var. “Rosenberg”. N: origen nucelar. C: origen cigótico (híbridos). Los números corresponden a diferentes muestras progenie.



Sin embargo, la confirmación con un segundo locus es siempre deseable para confirmar la condición híbrida del individuo, lo cual se realizó en el presente trabajo con

el uso de los marcadores TAA45 y cAGG09, cuyos polimorfismos de cada progenitor segregaron en la descendencia según la población correspondiente.

Los marcadores SSR constituyen una herramienta útil para el estudio de la diversidad genética de los cítricos por su eficacia e información que generan (Amara et al., 2011; Biswas et al., 2011). Su empleo para la detección de híbridos (Ruiz et al., 2000; Oliveira et al., 2002; Ahmad et al., 2012; Yildiz et al., 2013; Mondal et al., 2015) resulta más práctico, efectivo y ventajoso, debido a que los trabajos que utilizaron RAPD e ISSR (Bastianel et al., 1998; Andrade-Rodríguez et al., 2004; Golein et al., 2011) por lo general obtienen una gran cantidad de bandas monomórficas no informativas que pueden dificultar el análisis de los datos. Los RAPD e ISSR, al ser marcadores dominantes no permiten diferenciar individuos heterocigotos a diferencia de los SSR que son marcadores codominantes. Además, los RAPD presentan una baja reproducibilidad, ya que pequeñas modificaciones en la técnica tales como concentración de DNA molde, grado de pureza y fidelidad de la enzima DNA polimerasa, entre otros factores, pueden alterar el patrón de fragmentos amplificados de DNA generados para una muestra. Adicionalmente, los RAPD no son locus-específicos, por lo que perfiles electroforéticos de bandas no pueden ser interpretados en términos de loci y alelos, y fragmentos de tamaño similar pueden no ser homólogos (Martínez et al., 2010; Kumari y Thakur, 2014).

En este estudio se realizaron cruzamientos bidireccionales de *C. aurantifolia* X *C. limon*, obteniéndose un 42.5% de plantas híbridas cuando se utilizó a “Colimex” como receptor del polen, y un 81.4% cuando se empleó a “Rosenberg” con el mismo propósito (Tabla 2). Las toronjas, naranjas y mandarinas presentan más de un 90% de embrionía nucelar, dependiendo de la variedad. En limón mexicano, la proporción de plántulas nucleares es de 78%, mientras que para los limones italianos es de 32-33% (Frost y Soost, 1968). Los resultados de este trabajo presentaron porcentajes ligeramente inferiores, 57.5 y 18.6% de embrionía nucelar en “Colimex” y “Rosenberg”, respectivamente. Estos valores más bajos a los reportados previamente podrían deberse a factores nutricionales, así como a la interacción genotipo-ambiente (Kepiro y Roose 2007).

Tabla 2. Origen cigótico o nucelar de las poblaciones de *C. aurantifolia* X *C. limon* y su reciproca mediante análisis SSR utilizando dos pares de oligonucleótidos. C: cigótico. N: nucelar. I: Indeterminado.

<i>C. aurantifolia</i> (♀) X <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀) X <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
No.	Muestra	cAGG9	TAA45	No.	Muestra	cAGG9	TAA45
1	722	C	C	1	770	N	C
2	724	C	C	2	773	N	N
3	729	N	I*	3	783	C	C
4	731	N	N	4	787	C	C

<i>C. aurantifolia</i> (♀) X <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀) X <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
No.	Muestra	cAGG9	TAA45	No.	Muestra	cAGG9	TAA45
5	736	C	C	5	789	C	C
6	737	N	N	6	795	N	N
7	738	C	N	7	797	C	C
8	742	C	C	8	799	C	C
9	820	N	N	9	810	C	C
10	827	N	N	10	811	C	C
11	828	C	C	11	812	C	C
12	829	N	C	12	813	N	C
13	743	N	N	13	814	C	N
14	745	C	N	14	815	C	C
15	747	N	N	15	816	C	C
16	748	C	I*	16	817	C	C
17	750	C	N	17	818	C	C
18	752	C	C	18	819	C	C
19	754	N	N	19	821	N	N
20	761	N	N	20	825	N	N
21	788	N	N	21	840	C	N
22	790	C	C	22	841	C	C
23	794	C	C	23	842	N	N
24	796	N	N	24	843	C	C
25	798	N	I*	25	844	C	N
26	800	N	N	26	845	C	C
27	804	N	N	27	846	N	N
28	766	N	N	28	847	C	C
29	767	C	C	29	848	C	C
30	771	N	N	30	849	C	C
31	775	C	N	31	850	C	C
32	776	N	N	32	851	C	C
33	778	N	N	33	852	C	C
34	780	N	N	34	723	C	C
35	781	C	C	35	730	C	N
36	784	C	C	36	734	C	C
37	831	N	N	37	739	C	N
38	833	N	N	38	744	C	C
39	838	N	N	39	746	C	C

<i>C. aurantifolia</i> (♀) X <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀) X <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
No.	Muestra	cAGG9	TAA45	No.	Muestra	cAGG9	TAA45
40	839	C	C	40	749	C	C
-	-	-	-	41	751	C	C
-	-	-	-	42	755	C	C
-	-	-	-	43	760	C	C
No. plantas cigóticas		17 (42.5%)	13 (32.5%)			35 (81.4%)	32 (74.42%)
No. plantas nucelares		23 (57.5%)	24 (60%)			8 (18.6%)	11 (25.58%)

*I: No amplificó o presentó barrido el carril del gel.

En este estudio se consideraron como híbridos aquellos individuos con origen cigótico, ya que las polinizaciones se controlaron, evitándose eventos de autofecundación. Ambos marcadores, cAGG09 y TAA45, coinciden en un 80 y 83.72% en las plantas determinadas como híbridos para las poblaciones de *C. aurantifolia* X *C. limon* y su recíproca, respectivamente. Las muestras en las que ambos marcadores no coincidieron con el origen cigótico o nucelar de la progenie, se consideró el resultado del oligonucleótido cAGG09 debido a que amplificó bandas polimórficas bien definidas.

Por otro lado, se ha comparado la eficacia de las isoenzimas y marcadores SSR para detectar híbridos, concluyendo que los marcadores moleculares son más eficientes para este fin. En esta misma investigación utilizaron los oligonucleótidos empleados en este trabajo: TAA41 y TAA45 obteniendo polimorfismos que permitieron identificar el origen cigótico en poblaciones de *C. reticulata* X *C. sinensis* y autopolinización de *Poncirus trifoliata* (Ruiz et al., 2000). Aunque en el presente trabajo el uso del iniciador TAA41 amplificó patrones de bandas difusas no informativas. En otro estudio, combinaron el empleo de marcadores morfológicos asistido por marcadores moleculares SSR de la serie CCSM para detectar híbridos derivados de *C. reticulata* y *C. sinensis* (Oliveira et al., 2002). Sin embargo, únicamente confirmaron la condición híbrida de las plantas detectadas por morfología, por lo que queda en duda la posible existencia de más individuos con origen sexual que pudieran ser detectados por los marcadores SSR. Por su parte Ahmad et al. (2012) emplearon los iniciadores: TAA15, TAA27, TAA33 y otros más de la serie CCSM para detectar híbridos en tres poblaciones F1 de varias cruces de naranjas y mandarinas, logrando detectar 23 y 5 híbridos de las cruces de las variedades "NARC 05-18" X "Tarocco" y NARC 05-17 X "Sanguinello", respectivamente. Adicionalmente, identificaron 35 híbridos más de "Kinnow" X "Tarocco" con el marcador CCSM147. Yildiz et al., (2013) utilizaron los iniciadores TAA01, TAA3, TAA41, TAA45, TAA52, CAC33 y cAGG09 para detectar híbridos en varias poblaciones empleando

como receptores del polen a las mandarinas y realizando cruzamientos con naranjas y toronjas. De los 500 individuos que constituían las progenies de las diversas cruzas, los iniciadores AG14 y TAA3 fueron los más efectivos para identificar individuos cigóticos. Las mandarinas “Fremont” y “Robinson” produjeron 36.91 y 31.09% de plantas nucelares, respectivamente. Finalmente, Mondal et al. (2015) recientemente hicieron uso de los oligonucleótidos TAA15, TAA27 y TAA33 para detectar híbridos de *C. reticulata* y reportaron que ninguno de estos iniciadores permitió la identificación del origen sexual en la progenie evaluada, por lo que recurrieron a los iniciadores de la serie CCSM para su identificación. A pesar de que los marcadores SSR proveen información útil para la identificación de plantas híbridas en diferentes especies de cítricos, para este propósito se requiere de la implementación de técnicas como Tecnología de Diversidad por Arreglos (DARt, “Diversity Array Technology”), Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP, “Single Nucleotide Polymorphism”) o Fusión de Alta Resolución (HRM, “High Resolution Melt”), sin embargo, actualmente resultan muy costosas.

4 CONCLUSIONES

Los marcadores SSR permitieron la identificación eficiente de plantas cigóticas y nucelares en poblaciones progenie de limón mexicano “Colimex” y limón italiano “Rosenberg”. Con el uso del cebador cAGG09 se identificó la amplificación de 4 alelos polimórficos, suficientes para determinar el origen sexual de las plantas de limón mexicano; sin embargo, la confirmación con un segundo locus es siempre deseable para confirmar la condición híbrida de los individuos.

Se lograron identificar un total de 52 híbridos en las poblaciones de las cruzas *C. aurantifolia* (♀) X *C. limon* (♂) y *C. limon* (♀) X *C. aurantifolia* (♂). Además, los híbridos identificados pueden ser infectados con HLB en condiciones de campo para determinar el nivel de tolerancia a la enfermedad.

5 PERSPECTIVAS

Con los datos generados en este trabajo se pueden aprovechar los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 para ser purificados del gel de poliacrilamida y secuenciarse. Conocer la secuencia de nucleótidos de los fragmentos polimórficos permitirá realizar un análisis BLAST en la base de datos de NCBI para conocer con que función biológica están relacionados. Paralelamente, al conocer la secuencia de nucleótidos se podrán diseñar oligonucleótidos específicos para su amplificación por PCR y posterior visualización en geles de agarosa, los cuales consumen menor tiempo y

son más económicos en comparación con los geles de poliacrilamida para los marcadores SSR. De esta forma, la presencia o ausencia estos alelos PCR específicos podrá indicar la condición cigótica o nucelar de las muestras de una manera más práctica dentro del programa de mejoramiento genético del limón mexicano del INIFAP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, M.; Javaid, A.; Rahman, H.; Hussain, S. I.; Ramzan, A. and Ghafoor, A. 2012. Identification of mandarin X orange hybrids using Simple Sequence Repeat markers. *Journal of Agricultural Research*. 50(2): 225-232.

Amara, M. H.; Biswas, M. K.; Zhang, Z. and Guoa, W. W. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of citrus germplasm collection. *Scientia Horticulturae*. 128(3): 220-227.

Anderson, C. M.; Castle, W. S. and Moore, G. A. 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(2): 322-326.

Andrade-Rodríguez, M.; Villegas-Monter, A.; Gutiérrez-Espinosa, M. A.; Carrillo-Castañeda, G. and García-Velázquez, A. 2004. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia*. 39(4): 371-383.

Bastianel, M.; Schwarz, S. F.; Filho, H. D. C.; Lin, L. L.; Machado, M. and Koller, O. C. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*. 21(1): 123-127.

Biswas, M. K.; Chai, L.; Amar, M. H.; Zhang, X. and Deng, X. 2011. Comparative analysis of genetic diversity in citrus germoplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. *Scientia Horticulturae*. 129(4): 798-803.

Frost, H. B. and Soost, R. K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: W. Reuther, L. D. Batchelor and H. J. Webber (eds). *The Citrus Industry*, Vol. 1. University of California Press. Berkeley, California. pp. 290-324.

Golein, B.; Fifaei, R. and Ghasemi, M. 2011. Identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus* interspecific crosses by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 10(82): 18965-18970.

Kepiro, J. L. and Roose, M. L. 2007. Nucellar embryony. In: I. Khan (eds). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CABI. UK. pp. 141-149.

Khan, I. Q. and Kender, W. J. 2007. Citrus breeding: Introduction and objectives. In: I. Khan (eds). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CABI. UK. pp. 1-8.

Kijas, J. M. H.; Fowler, J. C. S.; Thomas, M. R and Roose, M. L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 701-706.

Koltunow, A. M.; Hidaka, T. and Robinson, S. P. 1996. Polyembryony in citrus. *Plant Physiology*. 110: 599-609.

Kumari, N. and Thakur, S. K. 2014. Random Amplified Polymorphic DNA. A brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 9(1): 6-13.

- Machado, M. A.; Cristofani-Yaly, M. and Bastianel, M. 2011. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP. Volume Especial, E: 158-172.
- Martínez, M. C.; Helguera, M. y Carrera, A. 2010. Marcadores moleculares. In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA. Argentina. pp. 70-85.
- Mendoza-Rodríguez, M. F.; Cervera-Goy, M. T.; Cabezas-Martínez, J. A.; Cenis, J. L. y Martínez-Zapater, J. M. 2001. Utilización de marcadores AFLP y SAMPL en la identificación genética de especies y variedades de cítricos. *Biotecnología Vegetal*. 1: 11-96.
- Mondal, B. and Saha, R. 2014. Identification of Zygotic and Nucellar seedling of *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata* using RAPD. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 15(1): 25-30.
- Mondal, B.; Pramanick, S.; Saha, R. and Karmakar, M. 2015. Application of Simple Sequence Repeat markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. *International Journal of Bioscience*. 6(2): 128-133.
- Oliveira, A. C.; Novac, G. A.; Cristofani, M. and Machado, M. A. 2002. Identification of Citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR. *Euphytica*. 128: 337-339.
- Omura, M. and Shimada, T. 2016. Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breeding Science*. 66(1): 3-17.
- Ruiz, C.; Paz, B. M. and Asins, M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedling in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*. 112: 89-94.
- Sanguinetti, C. J.; Neto, E. D. and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17(5): 915-919.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Atlas agroalimentario 2016. Primera Edición. www.gob.mx/siap. Fecha de consulta: 9 de febrero de 2017.
- Tozlu, I.; Guy, C. L. and Moore, G. A. 1999. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and non-saline environments. *Genome*. 42(5):1020-1029.
- Viloria, Z. and Grosser, J. W. 2005. Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 130(3): 392-402.
- Wutscher, H. K. and Hill, L. L. 1995. Performance of 'Hamlin' orange on 16 rootstocks in east-central Florida. *HortScience*. 30(1): 41-43.
- Yildiz, E.; Klapankiran, M.; Demirkeser, T. H.; Uzun, A. and Toplu, C. 2013. Identification of zygotic and nucelar individuals produced from several *Citrus* crosses using SSRs markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 41(2): 478-484.

CAPÍTULO 4

DINÁMICA DE CALIDAD, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE NOGAL PECANERA (*CARYA ILLINOINESIS* KOCH)

Data de submissão: 29/04/2023

Data de aceite: 16/05/2023

Joe Luis Arias-Moscoso

Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui
Ciudad Obregón, *Bácum* 85276
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0002-2548-4625>

Francisco Cadena-Cadena

Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui
Ciudad Obregón, *Bácum* 85276
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0001-5409-3909>

Felipe Reynaga Franco

Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui
Ciudad Obregón, *Bácum* 85276
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0002-8474-7763>

Alejandro García Ramirez

Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui
Ciudad Obregón, *Bácum* 85276
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0002-5719-8412>

Gilberto Rodríguez Pérez

Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui
Ciudad Obregón, *Bácum* 85276
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0003-2297-8598>

Dulce Alondra Cuevas-Acuña

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad de Sonora
85040, Obregón
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0002-6831-9523>

José Eliseo Ortiz Enríquez

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Norman E. Borlaug. Obregón
Sonora, México
<https://orcid.org/0000-0001-8100-692X>

Jesús Arnulfo Márquez Cervantes

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Norman E. Borlaug. Obregón
Sonora, México

RESUMEN: El nogal pecanero, es un cultivo relativamente nuevo en la zona del valle del

Yaqui, así como en el norte de México, debido a esto la información acerca del este cultivo es limitado. A pesar de que hay una extensa diversidad genética de este árbol, solo se ha explorado, recolectado, resguardado y caracterizado en términos varietales. Falta aún mucha información en diversos aspectos como el tipo de grasas mono y poliinsaturadas presentes en la nuez, así como en la dinámica del crecimiento y desarrollo, por lo anterior esta investigación fue orientada a conocer la dinámica de crecimiento, así como la calidad y el potencial de producción de dos huertas de nogal pecanero ubicadas en el Valle del Yaqui, para ello se realizó un monitoreo constante mediante la recolección de datos, toma de muestras de la planta, fruto y desarrollo en general en las distintas etapas de crecimiento del nogal.

PALABRAS CLAVE: Nogal pecanero. Dinámica de crecimiento. *Carya illinoensis* koch. Producción agrícola.

DYNAMICS OF QUALITY, GROWTH AND PRODUCTION OF PECAN WALNUT (*CARYA ILLINOENSIS* KOCH)

ABSTRACT: Pecan walnut is a relatively new crop in the Yaqui Valley area, as well as in northern Mexico, due to this, information about this crop is limited. Although there is a genetic diversity of this tree, it has only been explored, collected, protected and characterized in varietal terms. Much diverse information is still lacking in aspects such as the type of monounsaturated and polyunsaturated fats present in the walnut, as well as in the dynamics of growth and development, therefore this research was oriented to know the dynamics of growth, as well as the quality and the production potential of two pecan walnut orchards located in the Yaqui Valley, for which constant monitoring is carried out through data collection, taking samples of the plant, fruit and development in general in the different stages of walnut growth.

KEYWORDS: Pecan tree. Growth dynamics. *Carya illinoensis* koch. Agricultural production.

1 INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero, es un cultivo relativamente nuevo en nuestra zona dado que su origen se ubica en el sureste de Estados Unidos de América, así como en el norte de México por lo tanto hay poca información, a pesar de que hay una extensa diversidad genética de este árbol, hasta la fecha solo se ha explorado, recolectado, resguardado y caracterizado en términos varietales. Falta aún mucha información en diversos aspectos como el tipo de grasas mono y poliinsaturadas presentes en la nuez.

El nogal puede alcanzar un tamaño de treinta metros de altura y puede producir más de cien kilos de nuez por temporada, además, gracias a su longevidad puede mantenerse productivo hasta después de los cien años de edad. Para la formación del fruto tiene flores pistiladas (femeninas) y estaminadas (masculinas), y su polinización se lleva a cabo gracias al viento (anemófila).

El presente trabajo tiene la finalidad dar a conocer la dinámica de crecimiento, así como la calidad y el potencial de producción de dos huertas de nogal pecanero ubicadas en el Valle del Yaqui, para cumplir con el objetivo se realizaron monitoreos constantes, recolección de datos y toma de muestras. Las muestras fueron procesadas y analizadas en el Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias, la cual es una institución de excelencia científica y tecnológica con liderazgo y reconocimiento nacional e internacional por su capacidad de respuesta a las demandas de conocimiento e innovaciones tecnológicas en beneficio agrícola, pecuario y de la sociedad en general.

2 METODOLOGÍA

2.1 DINÁMICA DE CRECIMIENTO Y COSECHA

Se realizaron visitas a las dos huertas de nogal ubicadas en el Valle del Yaqui. En la huerta de nogal de 13 años se midió la dinámica de crecimiento del fruto a partir del 4 de junio hasta el 17 de septiembre en las cuales ya se tenían seleccionados los arboles de nogal y las nueces para tomar medidas polares y ecuatoriales (largo y ancho) del fruto, se fue monitoreando para conocer su crecimiento y desarrollo hasta el día de su cosecha (Aguilera, 2015; Ávila, et al., 2005).

La cosecha de la nuez se realizó en el periodo de agosto a septiembre con maquinaria: barredora y maquina vibradora, también se llevó a cabo de manera manual, la cantidad determinó la manera de cosechar (Grageda, et al., 2013; Grageda, et al., 2011).

Se revisó el fruto para ver si el ruezno estaba abierto, de esta manera nos dimos cuenta que el fruto estaba listo para ser cosechado. Con la maquina vibradora se removieron las nueces de los árboles, para que estas llegaran hasta el suelo después pasaron las maquinas o de ser necesario se realizó la recolección del fruto manualmente (I.I.A., 2008).

Se realizó la cosecha mediante un método determinado por cuatro centésimos de la producción estimada del fruto mediante la recolección del fruto caído por la vibración cosechando cada 1/100 (se divide en 100 partes) en los cuatro puntos cardinales. Esta actividad fue realizada en 10 árboles de cada huerta que crecen en diferentes tipos de suelo. La variedad de las nueces cosechadas de las dos huertas fueron Western y Wichita.

2.2 PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE CALIDAD DE LA NUEZ

Ya que las nueces fueron cosechadas y recolectadas, estas se pusieron a secar por un lapso de tres semanas para eliminar de ellas un porcentaje de humedad,

después se pesó la nuez entera y luego por separado, cascara y almendra para saber su porcentaje.

La producción se determinó de acuerdo al muestreo realizado de 4/100 a 100/100 para estudiar la producción por árbol y de acuerdo al número de árboles por hectárea se determinó la producción por hectárea obtenida (Zepeda, 2013).

Todas la evaluación de calidad se realizaron a partir de la toma de muestras de 10 unidades, para el peso de la nuez, la cáscara y almendra. Se obtuvo el porcentaje promedio tomando en cuenta el peso y la producción total (Trabichet, 2016).

Se midió el ruezno, las nueces germinadas, nueces buenas , nueces verdes y nueces dañadas (MundoHuerto, 2019).

En base a la información obtenida anteriormente se sacó el porcentaje total de nueces buenas y nueces con daños (físicos, fisiológicos, verdes, germinadas) (Madero & Trabichet, 2016).

3 RESULTADOS

3.1 DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL FRUTO Y COSECHA

Se encontró un rápido crecimiento del fruto a partir del 4 de junio al 15 de julio, tanto axial como polar, el crecimiento polar y axial se muestra en el cuadro 1. Los valores obtenidos nos sirven para determinar las mejores prácticas agrícolas que se han desarrollado tanto en fertilización como en manejo de riego principalmente, considerando que la primera etapa de crecimiento es la que requiere más fertilización y apropiada humedad del suelo (Aguilera, 2015; Martínez, et al. 2016).

Cuadro 1. Dinámica de Crecimiento del fruto.

Fecha de medición	Tipo de crecimiento	
	Polar	Axial
4 junio- 15 julio	27mm- 55mm	11mm-28mm
15 julio- 17 septiembre	55mm- 63mm	28mm- 38mm

3.2 PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE CALIDAD DE LA NUEZ

Se midió la longitud de los brotes con frutos y se contó el número de frutos por brotes, se realizaron en dos tipos de suelos (huertas distintas) una con suelo de aluvión y otra con suelo barrial profundo. Se obtuvo para la huerta con aluvión un peso de nuez de 9.7 gramos (por nuez), un porcentaje de hueras de 0.06%, de ruezno pegado 0.8% y de germinadas 28.2% de un total de 3016 kilogramos/ hectárea.

En la huerta de barrial profundo se obtuvo un peso de nuez de 9.6 gramos (por nuez), 4.8% de huera, 2.5% de ruezno pegado y 16.3% de germinadas de un total de 2933 kilogramos por hectárea.

Otro aspecto de calidad importante que se midió fue el porcentaje de almendra de las nueces cosechadas encontrándose resultados muy similares en ambas huertas, 59.3% de almendra en la huerta de terreno de aluvi3n y 58.6% en la huerta de barrial profundo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera, M. G. (2015). La Calidad de la Nuez Pecanera producida en México. Obtenido de RL Grupo Cuatro Exporta: <http://rlgrupocuatro.com/la-calidad-de-la-nuez-pecanera-producida-en-mexico/>.

Ávila, C. G., Jarquín, Z. X., Juárez, I. R., & Estrada, C. A. (2005). Comportamiento Hídrico De Hojas Y Frutos De Nogal Pecanero Y Su Relación Con La Clidad Y Germinación De Frutos. Obtenido de Tierra Latinoamericana: <https://www.redalyc.org/pdf/573/57311146009.pdf>

Grageda, J. G., Moreno, J. H., Navarro, L. A., & Figueiredo, F. V. (2013). XIV Simposio Internacional de Nogal Pecanero. Obtenido de Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias: http://www.zohrabsamani.com/research_material/files/Inifabmemoria-2013.pdf#page=57.

Grageda, J. G., Palma, R. S., Martínez, A. V., Flores, A. Q., Moreno, J. H., & Rodríguez, J. C. (2011). Salinidad Del Suelo En Huertas De Nogal Pecanero *Carya Illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. Obtenido de Universidad de Sonora, Biotecnia.

I.I.A. (2008). NOGALES: preparación para la cosecha. Obtenido de INFORMATIVO LA PLATINA, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación la Platina; Ministerio de Agricultura: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR34845.pdf>

Madero, E., & Trabichet, F. (2016). Manual de manejo del huerto de nogal pecán. Obtenido de INTA: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-_manual_del_huerto_de_nogal_pecan.pdf

Martínez, C. E., Garza, L. E., & Gutiérrez, E. T. (2016). Un árbol muy nuestro. El nogal pecanero y sus beneficios. Obtenido de CienciaCierta revista de divulgación científica, tecnologica y humanistica: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/2016/09/27/un-arbol-muy-nuestro-el-nogal-pecanero-y-sus-beneficios/>

MundoHuerto. (2019). Cuánto tarda en crecer un nogal. Obtenido de MundoHuerto: <http://www.mundohuerto.com/cultivos/nogal/cuanto-tarda-crecer>

Nuñez, J. H., Sabori, R., Valdez, B., & Fu, A. (02 de Marzo de 2015). NOGAL PECANERO. Obtenido de sitio wep sagarhpa sonora: <http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/paq-tec/paq-nogal-pecanero.pdf>

Peréz, J. H. (30 de junio de 2014). Manual para el manejo organico del nogal pecanero. Obtenido de Manual Para El Manejo Organico Del Nogal Pecanero: https://books.google.com.mx/books?id=JDjPDAAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Trabichet, F. (noviembre de 2016). Manual de manejo del huerto de nogal pecán. Obtenido de INTA: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-_manual/del/huerto/de/nogal/pecan.pdf

Zepeda, J. J. (2013). Manejo organico del nogal pecanero. Obtenido de Cultura organica: <http://www.culturaorganica.com/html/articulo.php?ID=63>.

CAPÍTULO 5

GERMINACIÓN *in vitro* DE TRES ESPECIES DE ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE LA REGIÓN SUROCCIDENTAL DEL ESTADO DE MICHOACÁN, MÉXICO¹

Data de submissão: 30/03/2023

Data de aceite: 18/04/2023

María Guadalupe Mendoza García

Instituto Tecnológico Superior de
Coalcomán (ITSC)
Laboratorio Químico-Biológicas
Academia de Ingeniería en
Desarrollo Comunitario
Coalcomán de Vázquez Pallares
Michoacán, México
ORCID: 0000-0002-6447-8236

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Tecomán
Laboratorio de Biotecnología
Tecomán, Colima, México
ORCID: 0000-0003-1949-1922

Susana de la Torre Zavala

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología
San Nicolás de los Garza
Nuevo León, México
ORCID: 0000-0002-7109-0467

Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez

Centro Nacional de Recursos
Genéticos del INIFAP
Laboratorio Agrícola-Forestal
Sección Conservación *in vitro*
Crioconservación de Tejido Vegetal
Tepatitlán de Morelos
Jalisco, México
ORCID: 0000-0002-2092-5284

RESUMEN: La familia de las orquídeas (Orchidaceae) está representada por aproximadamente 27,800 especies que abarcaba entre 600-800 géneros. Solamente en México se han registrado alrededor de 1,260 especies, donde el 40% de ellas, son endémicas. En un ambiente natural, la germinación de semillas mantiene un porcentaje muy bajo (3%), y solo una semilla germinada tiene la posibilidad de convertirse en planta adulta. En este contexto, se desarrolló el presente estudio, con el objetivo de micropropagar tres especies de orquídeas endémicas y bajo categoría de amenazadas: *Prosthechea citrina*, *Oncidium tigrinum* y *Stanhopea hernandezii* en medio de cultivo *in vitro* MS, enriquecido con dos reguladores de crecimiento Benciladenina (BA) y Ácido Giberélico (GA₃). Los resultados muestran que es posible la germinación *in vitro* de las especies, logrando un 62% a los 25 días para *P. citrina* (BA 0.05 mg/L y 0.5 mg/L GA₃), un 97 % a los 20 días para *O. tigrinum* (BA

¹ Esta información fue generada con recursos propios del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) durante una estancia de investigación de la estudiante María Guadalupe Mendoza García, quien obtuvo el grado de Ingeniería en Desarrollo Comunitario, en el Instituto Tecnológico de Coalcomán durante el año 2015 con los datos generados de este trabajo.

0.05 mg/L) y un 27% para *S. hernandezii* (BA 0.5 mg/L y GA₃ 0.05 mg/L). A partir de los resultados, se concluye que la germinación *in vitro* es una alternativa viable para la micropropagación de especies que se encuentran bajo categoría de riesgo, estableciendo bancos de germoplasma *in vitro* que permitan contar con material genético para fines de conservación e investigación.

PALABRAS CLAVE: Germinación. Micropropagación. Orquídeas. Reguladores de crecimiento.

In vitro GERMINATION OF THREE SPECIES OF ORCHIDS ENDEMIC FROM THE SOUTHWESTERN REGION OF THE STATE OF MICHOACAN, MEXICO

ABSTRACT: The orchid family (Orchidaceae) is represented by approximately 27,800 species comprising 600-800 genres. In Mexico alone, about 1,260 species have been recorded, 40% of which are endemic. In a natural environment, seed germination maintains a very low percentage (3%), and only one germinated seed has the possibility of becoming an adult plant. In this context, the present study was developed with the objective of micropropagating three species of endemic orchids and under threatened category: *Prosthechea citrina*, *Oncidium tigrinum* and *Stanhopea hernandezii* in MS *in vitro* culture medium, enriched with two growth regulators Benzyladenine (BA) and Gibberellic Acid (GA₃). The results show that *in vitro* germination of the species is possible, achieving 62% at 25 days for *P. citrina* (BA 0.05 mg/L and 0.5 mg/L GA₃), 97% at 20 days for *O. tigrinum* (BA 0.05 mg/L) and 27% for *S. hernandezii* (BA 0.5 mg/L and GA₃ 0.05 mg/L). From the results, it is concluded that *in vitro* germination is a viable alternative for the micropropagation of species that are under risk category, establishing *in vitro* germplasm banks that allow having genetic material for conservation and research purposes.

KEYWORDS: Germination. Growth regulators. Micropropagation. Orchids.

1 INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae está formada por plantas herbáceas perennes de la clase Liliopsida (monocotiledóneas) distribuidas en América y Asia y cuenta con aproximadamente 27,800 especies en el mundo (Beltrán, 2018). Por su ubicación geográfica, en el límite norte del trópico americano, México tiene registros alrededor de alrededor 170 géneros y 1,300 especies de orquídeas, de las cuales 585 son endémicas (Garay *et al.*, 2018) y representan casi el 40% (Salazar, 2013); mientras que hay reportes sobre la extinción de cerca de 22 especies (Hágaster *et al.*, 2005). En México, los estados que destacan por su diversidad y endemismo son Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (Garay *et al.*, 2018).

Michoacán tiene un registro de aproximadamente 200 especies, de éstas aproximadamente 25 están en categoría de riesgo. Las orquídeas se pueden encontrar en los bosques de pino-encino, en las copas de los árboles, sobre rocas y otras más creciendo sobre materia orgánica. En los últimos años, algunas especies de la familia

Orchidaceae, se han incluido en normas reguladas por instituciones ambientalistas para su protección, cuidado y conservación dentro y fuera de su hábitat (NOM-059-SEMARNAT, 2010). Lo anterior debido a la difícil germinación y propagación de plantas en sus ambientes naturales, sumándose a esto, el incontrolable saqueo ilegal y venta de las especies, incendios forestales, cambio de uso de suelos (Zhang *et al.*, 2018) y la transformación del ecosistema por la tala inmoderada de los bosques (Meng *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2019).

La germinación *in vitro* representa una técnica eficiente en la producción de orquídeas. Frente a esta alternativa se han desarrollado protocolos de micropropagación en medio MS para la propagación de orquídeas endémicas, las cuales han contribuido positivamente a los bancos de germoplasma para la conservación de la diversidad genética de estas plantas (Flores *et al.*, 2017), que tienen como fin, el resguardo de poblaciones e investigación científica, generando estrategias para almacenar semillas y plántulas de germoplasma que ayudan a incrementar el número de individuos por especies.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto y conscientes de la necesidad de incrementar el número de individuos por especie de orquídeas de la región suroccidental de Michoacán (Coalcomán), en un tiempo relativamente corto y con métodos eficientes, que conduzcan al éxito por el porcentaje de germinación a obtener, se desarrolló la presente investigación, con el objetivo de lograr la germinación *in vitro* de tres especies de la región referida, bajo el efecto de dos reguladores de crecimiento BA (Benciladenina) y GA₃ (Ácido Giberélico). Las especies en estudio son *Prosthechea*, orquídea endémica, considerada en estatus de protección especial (Pr), se conoce también como limoncillo, holoricua y azucena amarilla. *Oncidium tigrinum* y *Stanhopea hernandezii*, ambas consideradas como amenazadas (A) (NOM-059-SEMARNAT, 2010).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Campo Experimental Tecomán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el estado de Colima.

2.2 COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas provenientes de frutos o cápsulas verdes de tres especies de orquídeas colectadas en la región suroccidental del municipio de Coalcomán en

Michoacán, México (Tabla 1). La transferencia de las cápsulas del campo al laboratorio se realizó a través de una hielera. Las cápsulas fueron cortadas y colocadas en papel periódico, rotulándose con el nombre de la especie, lugar, coordenadas geográficas. En el laboratorio, las cápsulas fueron enjuagadas con agua corriente y almacenadas a 4°C hasta el momento de su uso.

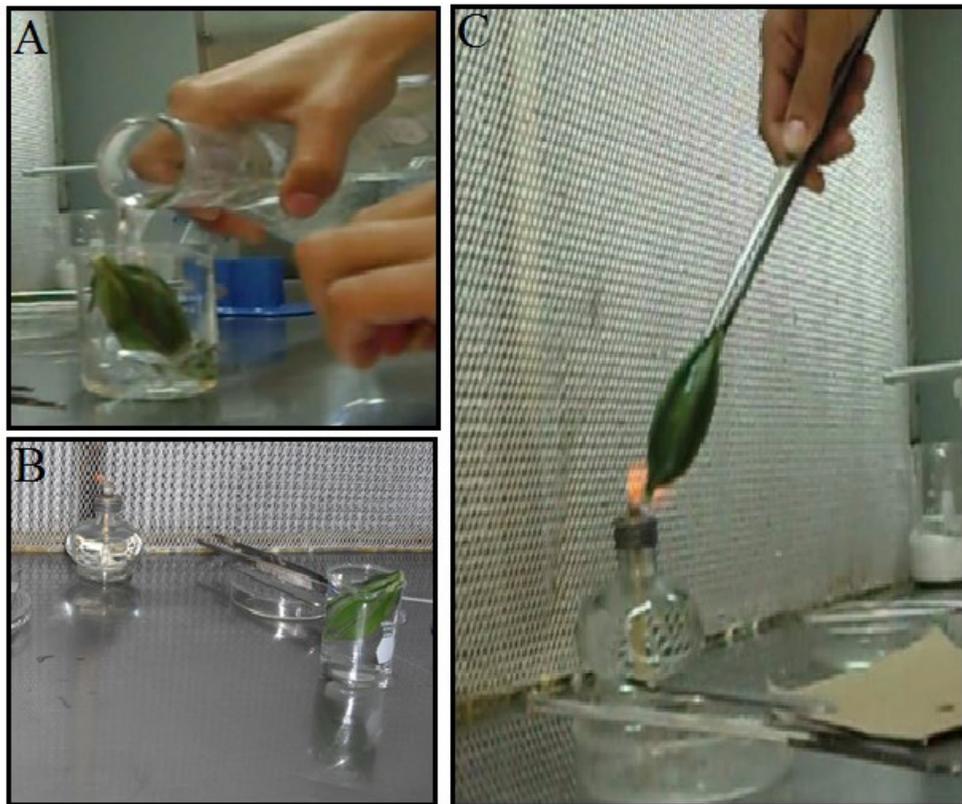
Tabla 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de las especies de orquídeas (Orchidaceae) en la Sierra de Coalcomán.

Nombre científico de la especie	Lugar de colecta sitio	Ubicación geográfica		m.s.n.m
		Latitud N	Longitud W	
<i>Prosthechea citrina</i>	La Capilla de Los Desmontes	181°53 ' 18.73"	102°59 ' 08.02"	2,162
<i>Oncidium tigrinum</i>	La Capilla de Los Desmontes	181°53 ' 18.73"	102°59 ' 08.02"	2,162
<i>Stanhopea hernandezii</i>	Desmontes de Buenavista y Cimientos	18°53 ' 09.3"	102°57 ' 51.2"	1,827

2.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El medio de cultivo seleccionado fue el MS al 100% (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g/L de sacarosa, 2.5 g/l de fitagel y 2g/L de carbón activado y un pH ajustado de 5.75. Para evaluar el porcentaje de la germinación se adicionó al medio de cultivo los reguladores de crecimiento BA (0, 0.05, 0.1 y 1 mg/L) y GA₃ (0, 0.5, y 1 mg/L). Previo a la siembra, las flores muertas se removieron con un bisturí y las capsulas fueron tratadas con una solución jabonosa de detergente neutro al 15%, se agregaron 3 gotas de tween 20 manteniéndose en agitación durante 15 minutos. Posteriormente, se colocaron las cápsulas en una solución de etanol al 70% durante 15 minutos. Y finalmente se sometieron a una solución de hipoclorito de sodio al 20% por 20 minutos. Bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar, las cápsulas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, fueron sumergidas en alcohol al 75% y flameadas con ayuda de un mechero (Figura 1) cuidando de no exponerse al fuego durante mucho tiempo, esto se repitió tres veces para asegurar su completa esterilización.

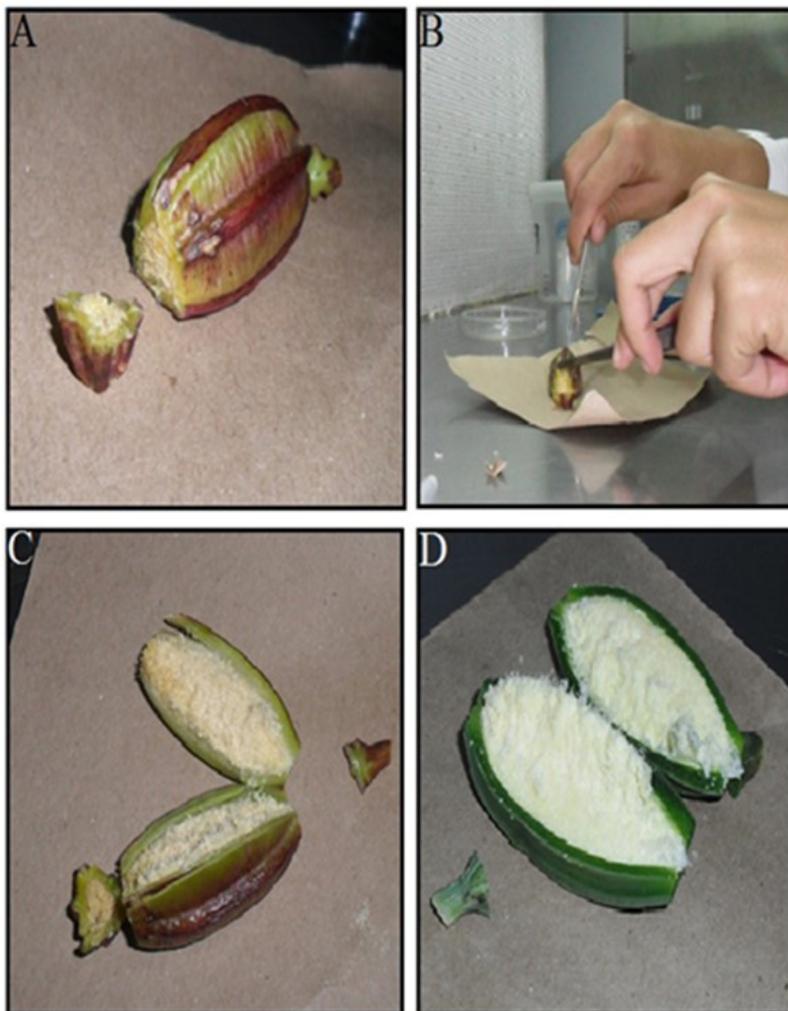
Figura 1. Procedimiento de desinfección de cápsulas dehiscentes en la campana de flujo laminar. A) Enjuagues con agua destilada estéril. B) Inmersión de la cápsula en etanol. C) Flameo de la cápsula.



2.4 SIEMBRA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Con ayuda de un bisturí se hicieron dos cortes para eliminar los extremos de la cápsula, para después hacer un corte transversal, cuidando de no tocar el interior de la cápsula (Figura 2). Para la distribución de semillas se utilizó una espátula y asa bacteriológica, depositándose las semillas en un tubo falcón. Posteriormente, se agregó 1 ml de agua destilada estéril, se agitaron en un vortex. Finalmente, se tomaron 50 μ l y se depositaron en las cajas Petri de manera uniforme.

Figura 2. Disección de la cápsula. A) Corte de los extremos de la cápsula. B) Corte longitudinal de la cápsula. C) Cápsula de *O. tigrinum*. D) Cápsula de *P. citrina*.



La cuantificación de las semillas por unidad experimental se realizó con un estereoscopio, el número de semillas cuantificado para la especie *O. tigrinum* fue de aproximadamente 800, ya que cuando las semillas se encuentran maduras se desprenden con facilidad y no se agrega tejido del interior de la cápsula. El número cuantificado para las especies *P. citrina* y *S. hernandezii*, fue de 250 aproximadamente. La diferencia en la concentración de semillas por microlitros se debe a la diferente maduración de las cápsulas, ya que las semillas de una cápsula con mayor maduración ocupan un espacio menor y son tomadas con la micropipeta con mayor facilidad, por el contrario, las semillas de cápsulas con menor tiempo de maduración ocupan un espacio mayor, porque tienen

tejido vegetal que se desprende del interior de la cápsula al ser incorporadas al tubo falcón. Se hizo la inoculación en cajas Petri y se transfirieron a un cuarto de crecimiento con temperatura media de 24°C y fotoperíodo de 12 horas luz.

2.5 VARIABLES EVALUADAS

Se determinó la germinación de forma cualitativa, evaluando cambios visibles y al estereoscopio, considerando como semillas germinadas aquellas cuyo embrión emergió de la cubierta seminal y se cuantificó el número de semillas germinadas por centímetro cuadrado (cm²), así como los días en que inicio la germinación. Finalmente se determinó un porcentaje de germinación para cada especie evaluada.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

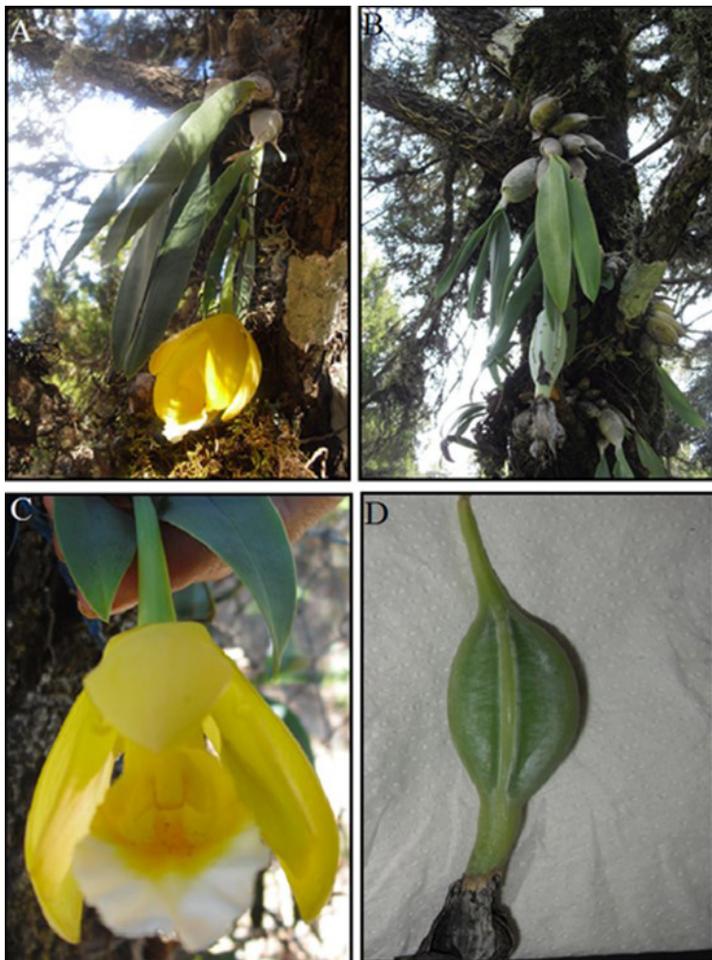
El diseño experimental establecido fue un diseño factorial completamente al azar de 4x3, uno por cada especie. Los factores fueron cuatro concentraciones de BAP (0, 0.05, 0.1 y 1 mg/L) y tres de GA₃ (0, 0.5, y 1 mg/L) con un total de 12 tratamientos por especie. Cada tratamiento se repitió 3 veces para tener un total de 108 unidades experimentales (cajas Petri). Los datos obtenidos de las variables para cada uno de los tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza. Para los casos que mostraron diferencias significativas, se llevó a cabo una prueba de comparación de medias de acuerdo con la prueba de Tukey al 95% de probabilidad con el paquete estadístico SAS

3 RESULTADOS

3.1 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO (BA Y GA₃) SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE *Prosthechea citrina*

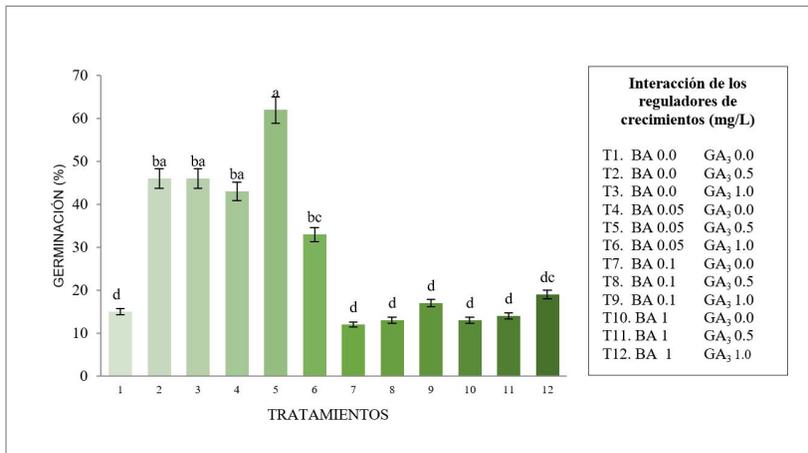
La orquídea *P. citrina* ha sido poco estudiada, existen escasos documentos que describen la morfología y procesos de micropropagación. El interés científico recae en que es una especie endémica de México, considerada de importancia ecológica en su ecosistema por la interacción con hongos micorrícicos y otros microorganismos, e interacciones con otras plantas (Castillo-Pérez *et al.*, 2019). Representa una de las orquídeas más admiradas en México (Figura 3) por su color, belleza y valor comercial en el mercado (Cazarez Favela *et al.*, 2016).

Figura 3. *P. citrina*. A) Planta epífita hospedera colgante con flor antes de la formación de la cápsula. B) Planta con cápsula antes de ser colectadas. C) Flor de color amarillo brillante y aromática. D) Cápsula verde colectada.



La germinación de semillas para la especie *P. citrina* se observó a los 25 días en el tratamiento 5 (BA 0.05 mg/L y GA₃ 0.5 mg/L) con un porcentaje de germinación del 62%, mediante la comparación de medias, existe diferencia significativa (Figura 4) con la combinación de reguladores de crecimiento (BA y GA₃), al igual el efecto por separado de hormonas.

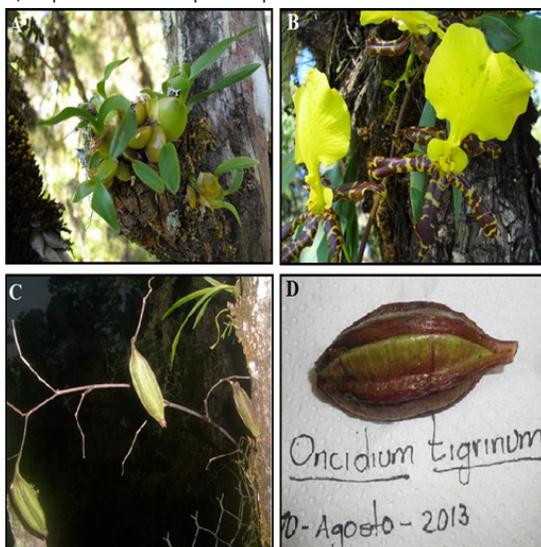
Figura 4. Efecto de los reguladores de crecimiento BA y GA₃ sobre la germinación *in vitro* de *P. citrina*, a los 25 días posteriores a la siembra. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.2 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO (BA Y GA₃) SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE *O. tigrinum*

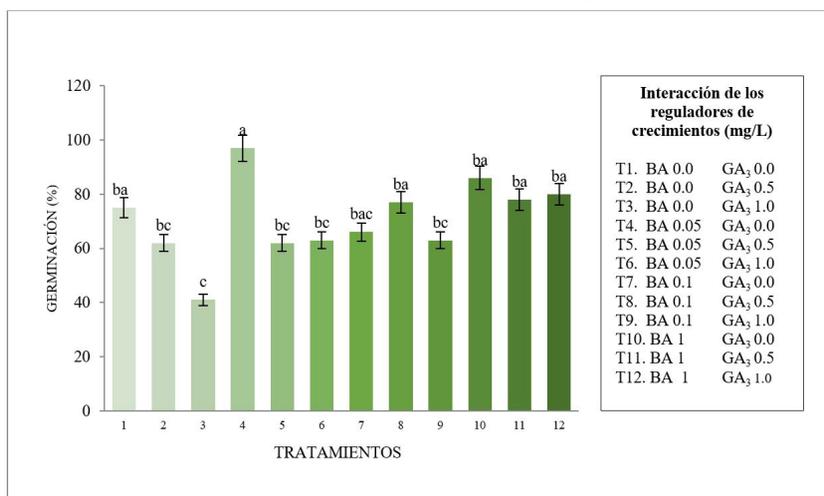
Oncidium tigrinum, es una especie epífita endémica de México. La distribución geográfica es desde Jalisco hasta Michoacán, en el Cinturón Volcánico Trans mexicano y la cordillera de la Sierra Madre del Sur en el sur de México (Mata-Rosas *et al.*, 2011). El hábitat y lugar de crecimiento contempla bosques templados de encino y bosques de pino-encino a una altitud de 2500 m (Jiménez *et al.*, 1998). Por su belleza, forma y colores que van desde amarillo y café (Figura 5), ha sido recolectada en las últimas décadas.

Figura 5. *O. tigrinum* A) Planta hospedadora en un sabino. B) Flores de color amarillo. C) Cápsulas con una maduración de 9 meses. D) Cápsula colectada para su posterior siembra.



Después de realizar la siembra de las semillas, se observaron cambios en la coloración, pasando por diferentes tonalidades; iniciando por el blanco-amarillo, verde-amarillo y verde tenue, apreciándose la hidratación de las semillas y el aumento de tamaño. La coloración de semillas verdes inicia a los 15 días, etapa en la que el embrión adquiere una coloración verde tenue por la absorción de agua y nutrientes. Para la especie *O. tigrinum* se detectaron diferencias significativas, el tiempo de germinación ocurrió a los 20 días en el tratamiento 4 (BA 0.05 mg/L) (Figura 6), con un porcentaje de germinación de 97 %.

Figura 6. Efecto de los reguladores de crecimiento BA y GA₃ sobre la germinación *in vitro* de *O. tigrinum* a los 20 días posteriores a la siembra. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.3 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO (BA Y GA₃) SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE *S. hernandezii*

La especie *Stanhopea hernandezii* (Orchidaceae) es una especie vegetal endémica de México, en los últimos años se ha visto amenazada, considerada como vulnerable (Castillo-Pérez *et al.*, 2019) por la belleza y diversidad de sus flores (Figura 7), tamaño y fragancia (Emeterio-Lara *et al.*, 2016).

Durante el proceso de germinación *in vitro*, la especie *S. hernandezii* inicia el rompimiento de la testa y dando lugar a la etapa de germinación a los 20 días, con un porcentaje del 29% para el tratamiento 5 (GA₃ 0.05 mg/L y BA 0.5 mg/L) (Figura 8). Para las diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento, no hay diferencias significativas ni para BA y GA₃ utilizados de forma individual.

Figura 7. *S.hernandezii*. A) Planta completa con inicio de floración creciendo sobre materia orgánica sobre una roca. B) Floración in situ. B) Planta con una cápsula de aproximadamente 5 meses de maduración. C) Cápsula colectada para su posterior siembra.

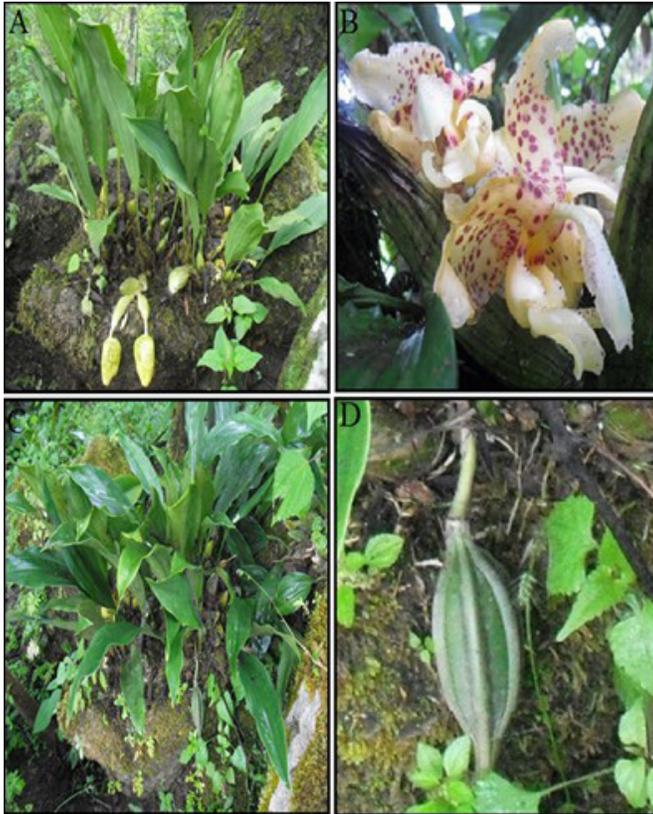
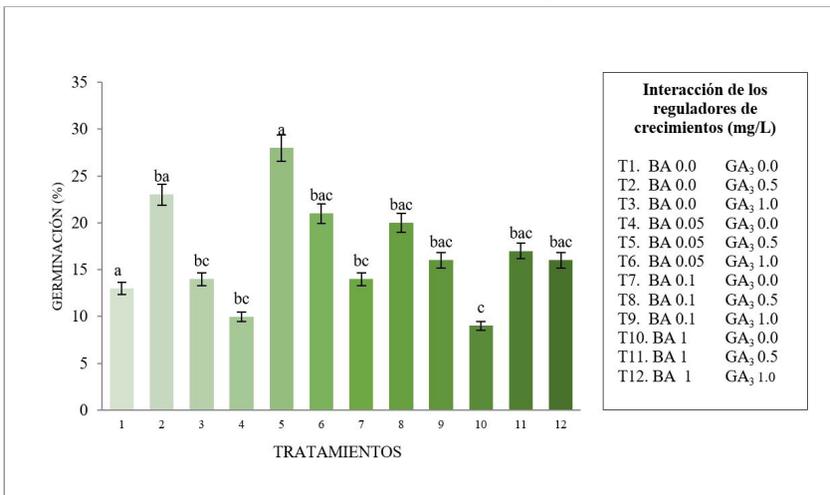


Figura 8. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la germinación *in vitro* de *S. hernandezii*, a los 20 días posteriores a la siembra. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.4 ETAPAS DE GERMINACIÓN DE LAS ORQUÍDEAS EN ESTUDIO

Durante la imbibición, se presentó un hinchamiento y un aumento en la masa embrionaria de las semillas ocasionado por la absorción de agua (Fig. 9A y 9B). Otras semillas presentaron una coloración verde muy acentuada y el tamaño del embrión incremento su circunferencia y longitud (Fig. 9C).

Figura 9. Microfotografías de las etapas de germinación y desarrollo del protocormo de *O. tigrinum*. A) Semillas con embriones. B) Imbibición de semillas. C) Semilla verde. D) Inicio de la germinación. E) Protocormo con aparición de rizoides F) Protocormo inicial con primer brote.



En la germinación el embrión rompió la testa e inicio la germinación (Fig. 9D); ciertos autores consideran a los embriones como germinados en esta etapa (Flores-Escobar *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2013). En el protocormo inicial, se formó un complejo de células de color verde muy tenue que dio lugar a la formación de rizoides (Fig. 9E); el protocormo siguió su crecimiento, apareciendo en el ápice un primordio foliar (Fig. 9F). El desarrollo de hojas continuó creciendo durante el primordio foliar y el cuerpo del protocormo comenzó a disminuir y a diferenciarse las hojas. Las observaciones sobre este proceso coinciden con las reportadas por otros autores (Cazarez Favela *et al.*, 2016; Flores-Escobar *et al.*, 2007).

4 DISCUSIÓN

En cuanto a los procedimientos utilizados para el cultivo *in vitro* de las orquídeas en estudio (*Prosthechea citrina*, *Oncidium tigrinum* y *Stanhopea hernandezii*), es importante mencionar el tiempo de almacenamiento de las cápsulas (25 días) no afectó la viabilidad de las semillas. En la literatura no hay registro sobre el tiempo de almacenamiento que pudiera afectar la calidad de las semillas (Ossebanch *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2010; Santiago, 2013), pero se recomienda no almacenar las cápsulas por periodos de tiempos largos, debiendo ser sembradas en el menor tiempo posible después de ser colectadas, sobre todo cuando se desconoce el tiempo de crecimiento, desarrollo y maduración del fruto y semillas.

El método de desinfección desarrollado para el establecimiento aséptico logró la desinfección de la cápsula sin contaminación microbiana detectable. La ventaja que presentan los frutos indehiscentes al momento de su desinfección es que el interior de la cápsula esta estéril e intacta, por lo que las semillas no requieren de un método de desinfección. La metodología de desinfección desarrollada por Mayo *et al.* (2010) fue la que se utilizó en esta investigación a diferencia de que en área estéril las cápsulas fueron sumergidas en una solución de alcohol etílico al 75%, método establecido por Ruíz *et al.* (2008) para la germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula*. De manera similar otros autores (McKendrick, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003; Santiago 2013), reportaron exitosamente el proceso de desinfección utilizando alcohol etílico al 70% para la inmersión de la cápsula y posteriormente el flameado de la misma.

En el presente estudio, no se realizó prueba de viabilidad de semilla, sin embargo, es importante que se realice ya que de esto depende el porcentaje de germinación alcanzado, mediante la prueba de coloración de tetrazolio, se conoce el grado de conservación y el desarrollo del embrión (Pérez & Castañeda, 2016). La probabilidad

de que haya bajos porcentajes de germinación en las orquídeas *P. citrina*, *O. tigrinum* y *S. hernandezii* se debe a la viabilidad que presentan las semillas, esto se debe a las características morfológicas que presentan, como su diminuto tamaño, la ausencia de endospermo (Huy *et al.*, 2019; Vecchio *et al.*, 2019), el estado de maduración de la cápsula (Mayo *et al.*, 2010) y el suministro de energía interno limitado (Prasongsom *et al.*, 2022).

La adición de carbón activado al medio de cultivo se ha reportado que contribuye positivamente en la germinación y crecimiento de las orquídeas propensas a la fenolización (Arzate-Fernández *et al.*, 2023). El medio de cultivo para el establecimiento de las tres especies de orquídeas adicionado con 2 mg/L de carbón activado, fue favorable en la absorción de las sustancias fenólicas logrando eliminar la oxidación, además de proporcionar un ambiente oscuro al medio tendiendo a aparentar condiciones naturales en la germinación de las semillas. Rodríguez *et al.* (2003) plantearon que el empleo de carbón activado a una mayor concentración (2 g/L) induce un efecto positivo para la variable (porcentaje de germinación). López-Puc y Herrera-Cool (2022) argumentan que el efecto que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas es un aumento de la aireación del medio de cultivo y absorción de etileno causante de inhibir el crecimiento y la diferenciación celular de protocormos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en el presente estudio, el tiempo de germinación y formación de protocormos para la especie *P. citrina*, ocurrió a los 25 días, posteriores a la siembra, con un porcentaje del 62%, alternativa eficiente y sustentando lo reportado por Cazarez Favela *et al.* (2016) en la emergencia de brotes agregando BA (Benciladenina) al medio de cultivo en concentraciones de 1.0 a 3.0 mg/L, por lo que se recomienda el uso de citocininas para la germinación de la especie y emergencia. En otro estudio, se logró germinar semillas de la orquídea de la especie *Prosthechea vitellina* en medio MS al 50% de la concentración de sales, enriquecido con diferentes concentraciones de BA (0.5 y 1.0 mg/L) con un porcentaje de germinación del 91.8% (Mora, 2021).

Para algunas orquídeas se ha reportado que la concentración y disponibilidad de BA influye en su porcentaje de germinación, de tal forma que, si la concentración es alta, la germinación es mínima. En la naturaleza solamente germina el 5 % de las semillas producidas y de estas solo un porcentaje pequeño logra cumplir su proceso de desarrollo hasta convertirse en plantas adultas (Pierik, 1990).

La especie *O. tigrinum* tiene un porcentaje de germinación de 97%, similar al reportado por otros autores (Mata-Rosas *et al.*, 2011) con un 100% de germinación a los 30 días con protocormos de un diámetro de 2 a 3 mm, en medio MS enriquecido

con BA, considerándose como necesario para la inducción de brotes de protocormos de *O. tigrinum*. Se han reportado porcentajes menores de germinación de 48% y 57% para la especie *O. stramineum* del mismo género (Flores-Escobar *et al.*, 2007). La alta tasa de germinación obtenida en el presente estudio se debe en parte, a que las cápsulas fueron colectadas cuando estas presentaron las condiciones necesarias según lo que reportan Mayo *et al.* (2010) como son la madurez de la cápsula y la presencia de embriones totalmente desarrollados. La formación de protocormos coincide con los reportados (Flores-Escobar *et al.*, 2007) quien al cultivar mitades de protocormos de *O. tigrinum*, encontró que el mejor tratamiento para la formación de rizoides y aparición de los primeros primordios foliares fue el adicionado con 0.05 mg/L de BA, obteniendo el porcentaje más elevado de sobrevivencia de protocormos. Por otra parte, Taiz y Zeiger (1998), establece que la aplicación directa de citocininas al medio de cultivo estimula el crecimiento de yemas laterales en muchas especies de orquídeas específicamente, anulando el efecto inhibitor del meristemo apical, efecto observado también en el desarrollo de las orquídeas reportadas en este trabajo.

Se ha observado que al adicionar BA en una dosis baja (0.05 mg/l), el proceso de germinación en general se acelera y es homogéneo, resultado que coincide con el reportado por Ávila y Salgado (2006). El tiempo de germinación que reportan es de 30 y 45 días después de la siembra. Esta respuesta se ha reportada para diferentes orquídeas cultivadas *in vitro* asimbióticamente, tales como *Bulbophyllum bufo* y *Odontoglossum pulchellum*. En este reporte, los resultados obtenidos para la especie *S. hernandezii* son bajos de apenas 29% a los 20 días para la combinación de reguladores de crecimiento (BA 0.05 y GA₃ 0.5 mg/L). Estos resultados son más bajos que los encontrados por Moreno y Menchaca (2007), quienes reportan un porcentaje de germinación del 90% para *S. tigrina*, especie del mismo género, utilizando el medio MS suplementando con agua de coco y homogeneizado de plátano en diferentes concentraciones.

El efecto del regulador de crecimiento GA₃ no tuvo un efecto significativo según la prueba Tukey (P<0.05), al adicionar 1 mg/L de GA₃ para la especie de *S. hernandezii*. En esta orquídea se logró un porcentaje de 21%, considerado como bajo en relación con los resultados obtenidos por Salazar (2012) donde se obtiene un porcentaje, de 94.1 % de germinación al ser adicionado el MS con 1 mg/L de GA₃. Es de suma importancia señalar que el proceso de la fecundación y maduración de la especie *S. hernandezii* puede verse afectada por ambientes húmedos y cálidos, lo que provoca semillas inviables (Velasco y Beltrán, 2008). Sin embargo, se requiere de estudios más detallados para determinar las causas de la formación de semillas no viables.

5 CONCLUSIONES

Con base en los resultados del presente trabajo, se logró la germinación de tres especies de orquídeas *P. citrina*, *O. tigrinum* y *S. hernandezii*, mediante la combinación de dos reguladores de crecimiento (GA_3 y BA). Alternativa eficiente para incrementar el número de individuos por especie de la familia Orchidaceae y como consecuencia, la disponibilidad de plántulas que conservan características fenotípicas, libres de patógenos, que conforman el banco de germoplasma de la institución, resguardando especies endémicas y en peligro de desaparecer como una herramienta que permita reducir la presión que se ejerce en sus poblaciones silvestres y que a su vez, sirva como modelo para la propagación masiva de otras especies de orquídeas, que se encuentren amenazadas y/o en vías de extinción, contribuyendo a su conservación y aprovechamiento sustentable.

Para la especie *S. hernandezii*, sin embargo, se consigue por primera vez el establecimiento *in vitro* de su germinación y desarrollo, se documentó la descripción de la especie para el Municipio de Coalcomán, Michoacán, y se determina que, para obtenerse un porcentaje de maduración mayor, las cápsulas deben de ser colectadas cuando muestren características morfológicas que permitan verificar la maduración de esta.

BIBLIOGRAFÍA

Arzate-Fernández, A., Rosas-Chávez, R., Norman-Mondragón, T. H., Corona-Rodríguez, M. C., & Piña-Escutia, J. L. (2023). Multiplicación *in vitro* de *Phalaenopsis* sp. usando reguladores de crecimiento vegetal, aguamiel y pulque (complejos orgánicos). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 26. <https://doi.org/http://doi.org/10.56369/tsaes.3981>

Ávila Díaz, I., & Garciglia Salgado, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Biológicas*, 8, 138–149.

Beltrán Nambo, M. D. (2018). Diversidad fúngica en raíces de orquídeas mexicanas y su contribución para la germinación y desarrollo inicial de plántulas *in vitro*. Tesis de Doctorado, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, Morelia Michoacán, México. Recuperado el 05 de 05 de 2022, de http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/3678/FB-R-D-2018-1182.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, A. J., & Carranza-Álvarez, C. (2019). The endemic orchids of Mexico: a review. *Biología* (74), 1-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>

Cazarez Favela, T., Graciano Luna, J. J., Solís González, S., Díaz González, S., Díaz Ramírez, B., Nájera Luna, J. A., & Montoya Ayón, J. B. (2016). Propagación *in vitro* de la orquídea *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins nativa del estado de Durango, México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* (67), 19-25.

Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L. M., & Mejía-Carranza, J. (2016). Usos y comercialización de orquídeas silvestres en la Región sur del Estado de México. *Polibotánica* (197-214), 42. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.42.1>

Garay Martínez, E. Z., Treviño Carreón, J., Hernández López, T. J., Mora Olivo, A., & Coronado Blanco, J. M. (2018). Las orquídeas endémicas mexicana en categoría de amenazadas. CIENCIA UANL (91). Obtenido de <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=8247>

Hágaster, E., Soto-Arenas, M. Á., Salazar, C. G., Jiménez, M. R., López, R. M., & Dressler, R. L. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México D.F.

Huy, N. P., Luan, D. T., Tung, H. T., Hien, V. T., Ngan, H. T., & Nhut, D. T. (2019). In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. *Scientia Horticulturae*, 252, 283-290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.063>

Quiroz, K., Saavedra, J., Vogel, H., Verdugo, G., Caligari, P. D. S., & García-González, R. (2017). In Vitro Asymbiotic Germination for Micropropagation of the Recalcitrant Terrestrial Orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*, 5(8), 1600142. <https://doi.org/10.3732/apps.1600142>

Flores Escobar, G., Legaria Solosano, J., & Gil Vásquez, M. (2007). In vitro propagation of *Oncidium stramineum* Lind., an endangered endemic mexican orchid. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México.

Guo, J.L., Cao, W.J., Li, Z.M., Zhang, Y.H., Volis, S., 2019. Conservation implications of population genetic structure in a threatened orchid *Cypripedium tibeticum*. *Plant Diversity* 22 (1), 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.12.002>

Jiménez, M. R., Sánchez, S. L., & García-Cruz, J. (1988). Familia Orchidaceae. Tribu Maxillarieae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fasc.

López-Puc, G., & Herrera-Cool, G. J. (2022). Asymbiotic germination, *in vitro* conservation and regeneration of *Catasetum integerrimum*. *POLIBOTÁNICA* (45), 135-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.18387/polibotanica.53.9>

Mayo, A., Cázares, J., Cruz, E., & Flores, A. (2010). Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de orquídeas silvestres de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villa Hermosa, Tabasco.

Mata-Rosas, M., Baltazar-García, R. J., & Chávez-Avila, V. M. (2011). In Vitro Regeneration through Direct Organogenesis from Protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae), an Endemic and Threatened Mexican Species, *HortScience horts*, 46(8), 1132-1135. Retrieved Apr 2, 2023, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.8.1132>

McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación de orquídeas *in vitro*. Foundation for Tropical Conservation. Ceiba.

Meng, Y.Y., Shao, S.C., Liu, S.I., Mgao, J.Y., 2019. Do the fungi associated with roots of adult plants support seed germination? A case study on *Dendrobium exile* (Orchidaceae). *Global Ecology and Conservation* 17. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00582>.

Mora, Y. (2021). Morfogénesis *in vitro* de *Prosthechea vitellina* (Lindley) W.E. Higgins. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/4619>

Moreno Martínez, D., & Menchaca García, R. A. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea Tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 9(2), 27- 32

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-479.

NOM-059-SEMARNAT. (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. 78. México D.F, México: Diario Oficial de la Federación.

Ossebanh, C., Arce, J., & Warner. (2007). Almacenamiento de semillas de diferentes especies de orquídeas para su conservación en un banco de germoplasma. *Tierra Tropical*, 3, 85-97.

Pierik, R. (1990). *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.

Pérez-Martínez, B., & Castañeda-Garzón, S. (2016). Propagación *in vitro* de orquídeas nativas como una contribución para la conservación *ex situ*. *Biotecnología vegetal*, 16(3), 143-151. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/519/pdf>

Prasongsom, S., Thammasiri, K., & Pritchard, H. W. (2022). Seed dormancy concepts in orchids: *Dendrobium cruentum* as a model species. *Seed Science Research*, 175-186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0960258522000198>

Rodríguez, L., González, R., Díaz, A., Fajardo, E., Sánchez, E., Hernández, J., et al. (2003). Influencia de diferentes factores en la germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de *Cattleya labiata*. *Biotecnología vegetal*, 3(2), 119-121.

Salazar, M. (2013). Orquídeas. Retrieved from, 3(12), 1-18. Recuperado el 05 de 05 de 2022, de http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salazar/orquideas_pedregal.pdf

Santiago Jerónimo, T. (2013). Propagación *in vitro* de *Epidendrum falcatum* Lindl. Tesis, Universidad de la Sierra Juárez, Biología, Ixtlán de Juárez.

Taiz, L. and Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*. 2nd Edition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts. <http://dx.doi.org/10.1071/PP9840361>

Vecchio, S., Pierce, S., Fantinato, E., & Buffa, G. (2019). Increasing the germination percent age of a declining native orchid (*Himantoglossum adriaticum*) by pollen transfer and outbreeding between populations. *Plant Biology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/plb.12986>

Velasco, L. O. y P. B. Beltrán. 2008. Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema. Consejería del Medio Ambiente. 2ª. Edición. Sevilla, España pp. 47-86.

Vera-Aguilar, A., Ramírez-Mosqueda, M. A., Lee-Espinosa, H. E., Llarena-Hernández, R. C., Rodríguez-Deméneghi, M. V., & Murguía-González, J. (2022). Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia anceps* ssp. *anceps* white variant from asymbiotic seed germination. *South African Journal of Botany*, 149, 376-380. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.013>

Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., Hu, H., 2018. Physiological diversity of orchids. *Plant diversity* 40, 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>

CAPÍTULO 6

ANÁLISIS DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS DE *DIAPHORINA CITRI* KUWAYAMA EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

Data de submissão: 21/04/2023

Data de aceite: 09/05/2023

Araceli Flores Aguilar

Maestría en Ciencias Agropecuarias
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz, México

Benito Hernández Castellanos

Facultad de Biología Xalapa
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz, México
Orcid: 0000-0001-6475-5232

Julio César Castañeda Ortega

Facultad de Biología Xalapa
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz, México
Orcid: 0000-0003-2663-9155

Diana Pérez Staples

Instituto de Biotecnología y
Ecología Aplicada
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz, México
Orcid: 0000-0002-6804-0346

Lourdes Cocotle Romero

Facultad de Biología Xalapa
Universidad Veracruzana
Xalapa, Veracruz, México
Orcid: 0000-0002-6763-8856

RESUMEN: En este estudio se analizó la proporción de sexos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en siete localidades del estado de Veracruz, México. Se recolectaron 50 psílicos en cada zona de muestreo: Álamo, Martínez de la Torre, Cerro Azul, Tepetzintlilla, Tihuatlán, Xalapa e Isla de Cabo Rojo. Se contabilizó la frecuencia de sexos mediante la prueba de Chi- cuadrada. La proporción de sexos para Álamo, Martínez de la Torre, Cerro Azul, Tepetzintlilla y Tihuatlán fue cercana al 50%, Xalapa 64 y 36 % e isla de Cabo Rojo fue de 76 y 24 % para hembras y machos respectivamente presentando diferencias significativas estas dos ($X^2=18.22$, $gl=6$, $p<0.05$). Los resultados indican que *D. citri* se ha distribuido ampliamente tanto en áreas con y sin actividad citrícola, y en estas últimas con un mayor porcentaje en el número de hembras. El presente es el primer reporte de la presencia de *D. citri* en las zonas de Xalapa, Tihuatlán, Tepetzintlilla y la Isla de Cabo Rojo.

PALABRAS CLAVE: Huanglongbing. Cítricos. *Candidatus Liberibacter* spp. Dragón amarillo.

ANÁLISE DA RAZÃO SEXUAL DE *DIAPHORINA CITRI* KUWAYAMA NO ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

RESUMO: Neste estudo, a razão sexual de *Diaphorina citri* Kuwayama foi analisada em sete locais no estado de Veracruz, México. Cinquenta psílicos foram coletados em cada área de amostragem: Álamo, Martínez de la

Torre, Cerro Azul, Tepetzintlilla, Tihuatlán, Xalapa e Ilha de Cabo Rojo. A frequência dos sexos foi contada usando o teste Chi-quadrada. A razão sexual para Álamo, Martínez de la Torre, Cerro Azul, Tepetzintlilla e Tihuatlán foi próxima de 50%, Xalapa 64 e 36% e Ilha Cabo Rojo foi de 76 e 24% para fêmeas e machos respectivamente, apresentando diferenças significativas entre estes dois ($\chi^2=18,22$, $df=6$, $p<0,05$). Os resultados indicam que *D. citri* tem se distribuído amplamente tanto em áreas com e sem atividade cítrica, sendo nestas últimas com maior percentual no número de fêmeas. Este é o primeiro relato da presença de *D. citri* nas áreas de Xalapa, Tihuatlán, Tepetzintlilla e Ilha Cabo Rojo.

PALAVRAS-CHAVE: Huanglongbing. Citrus. *Candidatus Liberibacter* spp. Dragão amarelo.

1 INTRODUCCIÓN

El estado de Veracruz es el principal productor en cítricos a nivel nacional, aporta el 65% del volumen total anual de limón persa del cual se obtienen 163 millones de dólares anuales por la exportación de este producto; la superficie cosechada de este cítrico durante el 2009 fue de 35,729.62 ha, lo que generó un valor de producción de 1,035.6 millones de pesos (Almaguer y Ayala, 2016). La zona más importante de huertas comerciales se encuentra en un área agrícola cercana a la parte norte del Golfo de México, con 258, 546 hectáreas (77% del total) distribuidas en los estados de Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León (SIAP, 2012).

Sin embargo, la citricultura en México se ha visto afectada por la llegada del Huanglongbing (HLB) considerada una de las enfermedades más devastadora y letales de la citricultura en el mundo (Bové, 2006). Cuyo agente causal es la bacteria "*Candidatus Liberibacter*", la cual es transmitida por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (Halbert y Núñez, 2004; Alemán *et al.*, 2007). *D. citri* es un insecto muy persistente, y sobrevive a una amplia gama de temperaturas extremas que van desde los 45°C en climas áridos hasta los -7°C en zonas húmedas subtropicales. Las ninfas se desarrollan bien durante la temporada de frío y en las primaveras húmedas, aunque en las zonas tropicales la sobrevivencia de las ninfas es más baja, por lo tanto, las poblaciones del psílido se reducen por el efecto combinado de calor y humedad (Garnier y Bové, 2000).

Actualmente se tiene reporte de la presencia de *D. citri* en prácticamente todos los estados citrícolas del país, su amplia distribución pone en problemas a toda la citricultura del país del cual dependen miles de familias mexicanas, por lo que conocer los sitios y entidades donde se presenta este vector transmisor del Huanglongbing de los cítricos, así como la relación de sexos es de vital importancia para la citricultura Nacional. Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la presencia y proporción de sexos de *D. citri*, en siete localidades del estado de Veracruz, México.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

En las localidades de Álamo, Martínez de la Torre, Cerro Azul, Tepetzintilla, Tihuatlán, Xalapa y la Isla de Cabo Rojo Veracruz (Tabla 1), en árboles de limón persa *Citrus latifolia* Tanaka, se recolectaron 50 psíldos, siguiendo la metodología OIRSA, (2018). Se seleccionaron 10 brotes nuevos en cada árbol y se aplicó la técnica de golpeo, en el caso de las plantas que se encuentran en las esquinas del cultivo fueron colocadas trampas amarillas especiales para el monitoreo de *D. citri*. Se determinó la presencia de *D. citri* y se contabilizó la frecuencia de sexos en las zonas antes mencionadas, mediante la prueba de Chi-cuadrada, con el programa Statistica 10.

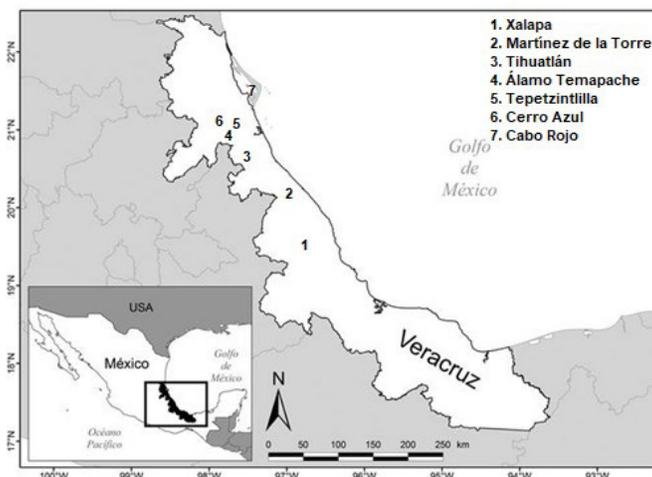
Tabla 1. Localidad y coordenadas de inicio y fin de los transectos donde se realizó la colecta de los ejemplares de *D. citri*.

Localidad	Coordenadas
Martínez de la Torre	20° 06' 10.9" N; 97° 00' 44.6" W
Tihuatlán	20° 45' 06.9" N; 97° 35' 00.1" W
Tepetzintilla	21° 11' 25.6" N; 97° 42' 00.0" W
Álamo	20° 54' 23.16" N; 97° 40' 25.69" W
Xalapa	19° 32' 52" N; 96° 54' 39" W
Cerro Azul	21° 11' 04" N; 97° 44' 56" W
Isla Cabo Rojo	21° 17' 55.51" N; 97° 26' 16.1" W

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

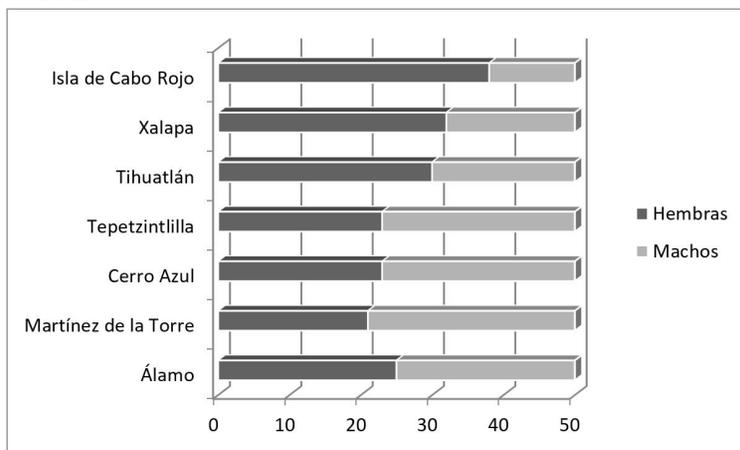
En todos los sitios de muestreo se reportó la presencia de *D. citri*, tanto en el norte como en el centro del estado de Veracruz, las localidades fueron: Álamo, Martínez de la Torre, Cerro Azul, Tepetzintilla, Tihuatlán, Xalapa y la Isla de Cabo Rojo (Figura 1).

Figura 1. Mapa de la distribución de *Diaphorina citri* en localidades del estado de Veracruz, los números indican el sitio de su localización.



El psílido asiático de los cítricos presentó una distribución de frecuencia para Álamo de 25 hembras y 25 machos, equivalente al 50 % para cada uno de los sexos, en el caso de Martínez de la Torre la frecuencia fue de 21 hembras y 29 machos, el equivalente al 42 y 58 % respectivamente, tanto para Cerro Azul como Tepetzintlilla la frecuencia fue 23 hembras y 27 machos el equivalente al 46 % y 54 %, para Tihuatlán la distribución de frecuencia fue de 30 hembras y 20 machos, con un porcentaje del 60 y 40 % respectivamente, para todos estos sitios la relación hembras y machos fue de 1:1. Para Xalapa la frecuencia de hembras fue de 32 hembras y 18 machos, con porcentajes del 64 y 36 %, con una relación de 2:1. En el caso de la Isla de Cabo Rojo la distribución absoluta fue de 38 hembras y 12 machos, equivalente a 76 y 24 %, relación 3:1. Por lo existen diferencias significativas ($X^2=18.22$, $gl=6$, $p<0.05$). Detalles de la frecuencia absoluta, relativa (Figura 2) y % de *D. citri* en estos sitios pueden ser apreciados en la tabla 2.

Figura 2. Frecuencia absoluta de sexos del psílido asiático de los cítricos *D. citri* en localidades del centro y norte del estado de Veracruz.



Los primeros reportes de *D. citri* para México fueron en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo, posteriores reportes indicaron su presencia en el norte del país en Tamaulipas y Nuevo León en el año 2004 (López-Arroyo et al., 2005). Para el año 2014 se reportó su presencia en 16 de los 24 estados citrícolas del país (SAGARPA, 2014). Por lo que para el año 2020 se estima que ya se encuentra el psílido presente en todos los estados citrícolas. Para Veracruz se reportó su presencia en el año 2002 (López-Arroyo et al., 2009). SAGARPA-SENASICA en su ficha técnica reportan a *D. citri* en 102 municipios del estado de Veracruz. En este estudio se reporta la presencia de *D. citri* en Álamo, Martínez de la Torre, Tihuatlán, Cerro Azul, Tepetzintlilla, Xalapa y la Isla de Cabo Rojo. En estas últimas cuatro localidades no se tenía reporte de la presencia del psílido.

Tabla 2. Distribución de la frecuencia absoluta, relativa y % de sexos de *D. citri* en las zonas de estudio del centro y norte de Veracruz. fi = frecuencia absoluta, fr= frecuencia relativa.

Sitio	fi	fr	%	fi	fr	%
	Hembras	Hembras	Hembras	Machos	Machos	Machos
Álamo Ver.	25	0.50	50	25	0.50	50
Martínez de la Torre Ver.	21	0.42	42	29	0.58	58
Cerro Azul Ver.	23	0.46	46	27	0.54	54
Tepetzintlilla Ver.	23	0.46	46	27	0.54	54
Tihuatlán Ver.	30	0.60	60	20	0.40	40
Xalapa Ver.	32	0.64	64	18	0.36	36
Isla de Cabo Rojo Ver.	38	0.76	76	12	0.24	24

La frecuencia de sexos entre hembras y machos en Álamo, Martínez de la Torre, Cerro Azul, Tepetzintlilla y Tihuatlán, presentó una relación 1:1 la cual coincide con lo reportado en Caldas, Cundinamarca y Córdoba Colombia por Zamora y Fúel (2014), así como lo reportado en Brasil en diferentes hospederos (Nava et al., 2007). En nuestro estudio también se reportó una proporción de 2:1 para hembras y machos en Xalapa, y de 3:1 en la Isla de Cabo Rojo, mismo que coincide con lo reportado en Tamaulipas (González, et al., 2013) y en Antioquia y Santander (Zamora y Fúel, 2014).

La selección sexual podría dar respuesta al porque mayor número de hembras (Cordero y Santolamazza, 2009), tal vez como estrategia reproductiva, para mantener el mayor número de individuos ante el ataque de depredadores. La mayor proporción de hembras permite la supervivencia de la población; al tener mayor número de hembras aumenta la reproducción y por tanto el número de individuos, el éxito reproductivo de las poblaciones de *D. citri* están relacionadas directamente con el mayor número de hembras, lo que se traduce en mayor número de huevos, más individuos y mayor probabilidad de dispersión, por lo que resulta más difícil su control. Las estrategias en México del manejo de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos se basa en el control de *D. citri*, vector transmisor de *Candidatus Liberibacter*, bacteria causante de la enfermedad, por lo que es necesario más estudios de dimorfismo sexual y estrategias reproductivas de este psílido en las zonas cítricas de México.

4 CONCLUSIONES

El éxito reproductivo de las poblaciones de *D. citri* probablemente se encuentre relacionado directamente con el mayor número de hembras, lo que representa un grave problema para la citricultura en esta región considerando que es un organismo plaga. Hasta donde conocemos, este es el primer reporte de la presencia de *D. citri* en las zonas de Xalapa, Cerro Azul, Tepetzintlilla y la Isla de Cabo Rojo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemán, J., Baños, H., y Ravelo, J. (2007). *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. *Revista Protección Vegetal*, Vol. 22, No. 3, 154–165.
- Almaguer, V.G. y Ayala, A.V.G. (2014). Adopción de innovaciones en limón persa (*Citrus latifolia* Tan.) en Tlapacoyan, Veracruz. Uso bitácora. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 20 No. 1, 89-100.
- Cordero, R.A., y Santolamazza, C.S. (2009). Darwin y la selección sexual después de la cópula. *Revista Digital Universitaria*, Vol. 10, No. 6, 1-13.
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant Pathology*, Vol. 88, No. 1, 7–37.
- Garnier, M. y J.M. Bové. (2000). Huanglongbing in Cambodia, Laos and Myanmar. En J. V. da Graca, R. F. Lee y R. K. Yokomi (Eds.), *Proceedings of 14th Conference IOCV* pp. 378-380.
- González, G.O.J., Lugo G.C.H., y Salazar, O.C.A. (2013). Aspectos de la ecología poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), en la región centro del estado de Tamaulipas, México [Ponencia]. Memorias 25º Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México.
- Halbert, S.E., y Núñez. C.A. (2004). Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist*, Vol. 87, No. 3, 401-402.
- López-Arroyo, J.I., Peña, M.A. Rocha Peña, M. A. y Loera, J. (2005). *Ocurrencia en México del psílido asiático Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) [Ponencia]. Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., México.
- López-Arroyo, J.I. y Loera-Gallardo, J. (2009). Manejo integrado de insectos y ácaros plaga de los cítricos, En M.A. Rocha y J. E. Padrón (Eds.), *El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León*. (pp. 260-323). CIRNE.
- Nava, D.E., Torres. M.L.G., Rodrigues, M.D.L., Bento, J.M.S. y Parra, J.R.P. (2007). Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different host plants at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, Vol.131, 709–15.
- OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). (2018). Protocolo para el monitoreo de *Diaphorina citri* Kuwayama (HemipteraPsyllidae) TAIWAN-ICDF.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). (18 de agosto del 2020). *Datos históricos sobre los principales estados productores de cítricos en el país, 2014*. Recuperado de: <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (10 de marzo del 2020). *Producción agrícola por cultivo y por estado. México, 2012*. Recuperado de: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350.
- Zamora, J. y FUEL. S. (2014). Dinámica poblacional del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama. Publicado en: *Diaphorina citri*. Identificación de la dinámica poblacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en los cultivos de cítricos de Colombia: una herramienta para implementar un sistema piloto de seguimiento de poblaciones del insecto vector del HLB. Universidad Nacional de Colombia DOI: 10.13140/2.1.5056.6087.

CAPÍTULO 7

EL POLVO DE DIATOMEAS ES UNA OPCION SUSTENTABLE PARA PROTECCIÓN DE MAIZ ALMACENADO

Data de submissão: 29/04/2023

Data de aceite: 16/05/2023

José Guadalupe Loya Ramírez

Universidad Autónoma de
Baja California Sur
La Paz, Baja California Sur, México
<https://orcid.org/0009-0004-8617-9562>

Félix Alfredo Beltrán Morales

Universidad Autónoma de
Baja California Sur
La Paz, Baja California Sur, México
<http://orcid.org/0000-0002-9446-3916>

Sergio Zamora Salgado

Universidad Autónoma de
Baja California Sur
La Paz, Baja California Sur, México

Francisco Higinio Ruiz Espinoza

Universidad Autónoma de
Baja California Sur
La Paz, Baja California Sur, México
<https://orcid.org/0000-0002-0815-3007>

Jesús Navejas Jiménez

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales Agrícolas y Pecuarias
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0009-0005-8709-8913>

RESUMEN: El polvo de diatomeas (PD) es un material que ha demostrado efectividad contra poblaciones de plagas en diferentes cultivos. La protección de los granos almacenados, con PD va en aumento en virtud de su baja toxicidad para mamíferos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del PD sobre el picudo de los granos de maíz, *Sitophilus zeamais* M. En el experimento 1, los tratamientos fueron: un testigo y cinco dosis de PD equivalente a 0.04, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 gr / kg de grano, los cuales fueron aplicadas a 20 adultos de picudos en 200 gr de maíz confinados en frascos de 0.5 l. En el experimento 2, los tratamientos fueron: un testigo y tres dosis de PD (0.5, 1.0 y 2.0 gr/kg de grano), los cuales fueron aplicados a 20 adultos de picudos confinados en frascos de 2.0 L. La dosis de 0.40 gr de PD fue la más efectiva porque causó una mortandad de 66.3% picudos en 52 días. Mientras que, las dosis de 2.0 y 0.5 gr de PD causaron 100 y 90% de mortandad de picudos, respectivamente. La aplicación de PD permite un control sustentable del picudo de los granos de maíz.

PALABRAS CLAVE: *Sitophilus zeamais*. Silicio. Grano sano.

DIATOM POWDER IS A SUSTAINABLE OPTION FOR PROTECTION OF STORED CORN

ABSTRACT: Diatom powder (DP) is a material that has proven effective against pest

populations in different crops. The protection of stored grains with DP is increasing due to its low toxicity to mammals. The objective of this research was to evaluate the effect of PD on the maize grain weevil, *Sitophilus zeamais* M. In experiment 1, the treatments were: a control and five doses of DP equivalent to 0.04, 0.8, 1.2, 1.6 and 2.0 gr / kg of grain, which were applied to 20 adults of weevils in 200 gr of corn confined in jars of 0.5 l. In experiment 2, the treatments were: a control and three doses of DP (0.5, 1.0 and 2.0 gr/kg of grain), which were applied to 20 adults of weevils confined in 2.0 L bottles. The dose of 0.40 g of DP was the most effective because it caused a mortality of 66.3% weevils in 52 days. Whereas, doses of 2.0 and 0.5 g of PD caused 100 and 90% of weevil mortality, respectively. The application of PD allows a sustainable control of the weevil of corn grains.

KEYWORDS: *Sitophilus zeamais*. Silicon. Healthy grains.

1 INTRODUCCIÓN

Numerosos reportes coinciden en que el polvo de diatomeas (PD) ha sido exitoso en el control poblaciones de plagas en diferentes cultivos. El PD tiene un contenido de silicio alto que alcanza hasta un 90% y ha sido ha sido aplicado para el control de plagas de almacén. El PD tiene un origen orgánico y tiene alto contenido de dióxido de silicio y restos de algas diatomeas de agua dulce y de mar. El resto del contenido del PD está constituido por minerales como: calcio, fosforo, azufre, níquel, zinc, manganeso, aluminio, hierro, magnesio, sodio y cal (Cook y Armitage, 2000).

El uso de PD, como un insecticida contra granos almacenados, ha aumentado considerablemente en virtud de su toxicidad baja para mamíferos (Athanassiou *et al.*, 2005). Además, el PD tiene tres atributos que deben ser destacados: no contamina el ambiente, no afecta la salud humana y retarda la resistencia de insectos plaga a insecticidas sintéticos (Ortega Cruz *et al.*, 2016). Estos autores encontraron resultados satisfactorios en la protección del frijol almacenado contra el gorgojo del frijol, *Zabrotes subfasciatus* Boh., Otra ventaja sobresaliente del PD es que pueden ser combinadas con otras alternativas de bajo riesgo como: temperaturas altas y hongos entomopatógenos (Machekano *et al.*, 2020). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del PD sobre el picudo de los granos de maíz.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. En el experimento 1, los tratamientos fueron un testigo y seis dosis de PD: 0.08, 0.16, 0.24, 0.32 y 0.40 gr/200 gr de grano. Estas dosis equivalen a 0.40, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 gr/kg de grano, respectivamente. Los tratamientos fueron aplicados a 20 adultos de picudos en 200 gr de maíz contenido en frascos de 0.5 L.

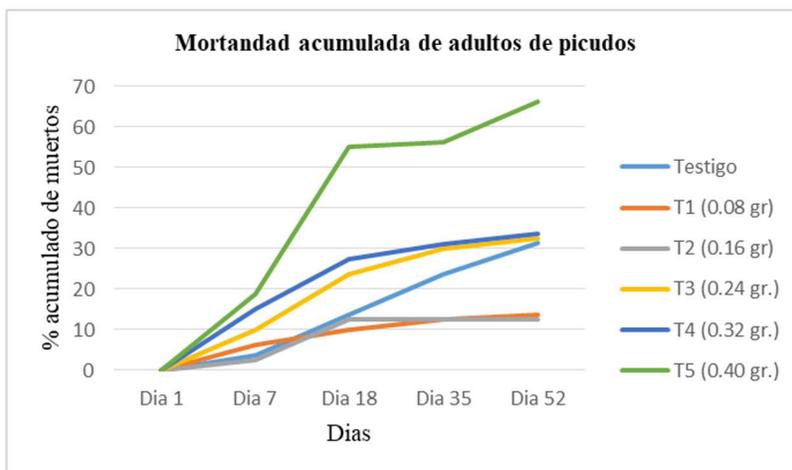
Las variables que fueron medidas como indicadores de la efectividad de los tratamientos fueron dos: número de picudos muertos y número de adultos emergidos en la primera generación. En cada lectura, los picudos muertos fueron removidos del frasco, pero los granos se mantuvieron en observación para registrar la emergencia de la progenie.

En el experimento 2, los tratamientos fueron: un testigo y tres dosis de PD: 0.5, 1.0 y 2.0 gr/kg de grano. Los tratamientos fueron aplicados a 20 adultos de picudos contenidos en frascos de 2.0 L. El diseño experimental para ambos experimentos fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de separación de medias.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el porcentaje acumulado de adultos de picudos muertos en cada tratamiento. El tratamiento 5 (0.40 gr) fue el más efectivo con una mortandad de 66.3% picudos, seguido de los tratamientos 3 (0.24 gr) y 4 (0.32 gr) que causaron un 32.5 y 33.7% de mortandad, respectivamente. Los tratamientos 1 (0.08 gr.) y 2 (0.16 gr.) causaron solamente un 14 y 12.5% de muertos, respectivamente. Estos datos difieren de los reportados por Torres-Bojorquez (2011) quien determinó el 100% de picudos muertos a los 30 días después de la aplicación de la PD. Este es cercano a la mitad del tiempo necesario para obtener el 100% de muertos en el presente bioensayo. Cabe destacar que el tratamiento de 0.40 gr continuó causando muertes hasta los 52 días después de haber aplicado. Evidentemente, esta duración del efecto letal del PD supera a los insecticidas tóxicos sintéticos en el mercado.

Figura 1. Porcentajes de mortalidad acumulada de picudos, durante 52 días, en cinco dosis de PD.



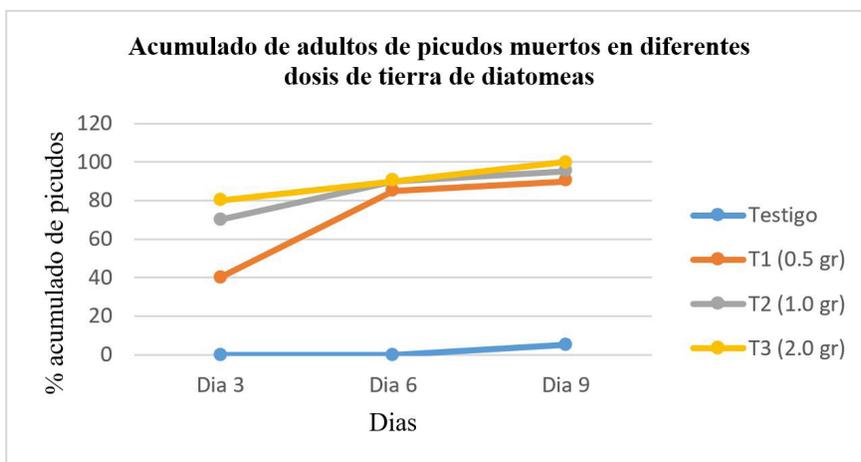
El Cuadro 1 presenta la separación de medias de picudos muertos por cada tratamiento ($p \leq 5\%$). El tratamiento 4 (0.40 gr/kg) superó a los demás porque mató al 100% de los picudos. Este resultado coincide con el de Zhandá *et al.* (2020) quienes reportan un 100% de mortalidad con dosis de 75.0 gr y 100.0 gr/ kg de grano. Estos datos confirman que una dosis adecuada de PD puede proteger al grano de maíz suficientemente sin necesidad de agregar compuestos contaminantes sintéticos.

Cuadro 1. Separación de medias (Duncan 5%) de picudos muertos (n=20) en los cuatro tratamientos al cabo de nueve días del tratamiento con PD.

Tratamiento (gr de PD/kg de grano)	X=muertos	$p \leq 0.05$
2.0	20	a
1.0	19	ab
0.5	18	b
Testigo	1	c

La Figura 2 indica la mortandad acumulada de adultos de picudo en tres dosis de PD durante 9 días después del tratamiento. El tratamiento 4 (2.0 gr/kg) fue el más efectivo con un 100.0% de mortandad de picudos al cabo de 9 días. Mientras que el tratamiento 2 (0.5 gr/kg) causó una mortandad de 90.0% de picudos. Este resultado de la dosis de 2.0 gr/kg superó a los de Torres-Bojórquez (2011) quien encontró el 100% de nuestros a los 30 días. Cabe destacar que un lapso de 30 días para matar al 100% de los picudos es irrelevante por dos razones: primeramente, en 30 días el picudo no alcanza a producir progenie y, además, el adulto de picudo no causa un daño de importancia económica en el grano.

Figura 2. Mortandad acumulada de picudos, durante nueve días, con dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 gr de PD por kg de grano.



El Cuadro 2 presenta el efecto de PD sobre la progenie, en la primera generación, de los picudos tratados con cuatro dosis de PD. Los datos de emergencia de la primera generación de picudos, que fue registrada en cuatro fechas diferentes después del tratamiento, muestran que los tratamientos más efectivos fueron: 0.24 gr y 0.32 gr/kg de grano con valores de 8.0 y 5.0 picudos, respectivamente, emergidos a los 52 días después del tratamiento. El número de picudos emergidos en la progenie fueron 8.0 en el tratamiento con 0.24 gr y 5 en el tratamiento 0.32 gr. Al comparar los 8.0, 5.0 y 11.0 picudos, que emergieron en las dosis de 0.24, 0.32 y 0.40 gr/kg, respectivamente, contra los 930 picudos del testigo, significa que la emergencia en estas tres dosis fue reducida en un 99.1, 99.5 y 98.8%, respectivamente. Este resultado coincide con los de Wille *et al.* (2019) quienes encontraron que el PD puede mantener poblaciones bajas de adultos de picudo en las generaciones subsiguientes.

Cuadro 2. Efecto de la PD en la reducción de la progenie en la primera generación del picudo de los granos de maíz del experimento 1.

Dosis (gr de PD/kg)	No. de picudos vivos				% de reducción
	Día 7	Día 18	Día 35	Día 52	
Testigo	670	471	517	930	0.0
0.08	112	184	59	133	85.7
0.16	78	85	17	45	95.1
0.24	43	72	12	8	99.1
0.32	37	52	7	5	99.5
0.40	69	78	7	11	98.8

4 CONCLUSIONES

En el primer experimento, la dosis más alta (2.0 gr/kg de grano) causó el 66% de mortandad acumulada de picudos en 52 días después del tratamiento. Mientras que en el segundo experimento, la dosis mayor de 2.0 gr/kg fue la más efectiva porque causó un 100% de muertos en nueve días. La progenie del picudo se vio notablemente reducida por la aplicación de PD. El efecto del PD sobre la progenie de la primera generación fue notoriamente efectivo. Las dosis 0.24, 0.32 y 0.40 gr/kg de grano causaron una disminución en la progenie superior al 98.8%.

LITERATURA CITADA

Athanassiou C.G., Vayias B.J., Dimizas C.B., Kavallieratos N.G., Papagregoriou A.S and Buchelos CTh. 2005. Insecticidal efficacy of diatomaceous earth against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleóptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleóptera: Tenebrionidae) on stored wheat: influence of dose rate, temperature and exposure interval. Journal Stored Products Resources. Vol. 41. Pp. 47-55.

Cook D. A. and Armitage D. M. 2000. Efficacy of a diatomaceous earth against mite and insect populations in small bins of wheat under conditions of low temperature and high humidity. Pest Management Science. Vol. 56. Pp.591-596.

Machekano H., Mutamiswa R., Singano D., Joseph V., Chidawanyika F. and Nyamukondiwa C., 2020. Thermal resilience of *Prostephanus truncatus* (Horn): can we derive optimum temperature-time combinations for commodity treatment. Journal Stored Products Resources. Vol.86. N° 101568. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101568>.

Ortega Cruz J., Ruvalcaba L., Alcaraz T., Liera, J., Valdés, T. and Ortiz L. 2016 Effectiveness of Different Doses of Diatomaceous Earth on Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman) in Culiacán, Sinaloa, México. Open Access Library Journal. Vol. 3. Pp. 1-11. doi: 10.4236/oalib.1103228.

Torres-Bojórquez A. I. 2011. Efectividad de la tierra de diatomeas en el control de tres plagas de almacén. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agrícola. Marín, Nuevo León. Pp. 84.

Wille C. L., Wille C. P., Darosa J. M., Boff M. I. C. y Franco C. R. 2019. Efficacy of recovered diatomaceous earth from brewery to control *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* Journal of Stored Products Research. Vol 83, pp.254-260.

Zandha J., Mvumi M. V. and Machekano H. 2020. Potential of three enhanced diatomaceous earth against *Sitophilus zeamais* M. and *Prostephanus truncatus* Horn on stored maize grain. Journal of Stored Products Research. Vol 87, pp.6.

CAPÍTULO 8

ANÁLISIS BIOECONÓMICO DEL CULTIVO INTENSIVO FOTO-HETEROTRÓFICO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN ALTA SALINIDAD CON REPOSICIÓN MINIMA DE AGUA, PARA EL CICLO VERANO-OTOÑO

Data de submissão: 23/03/2023

Data de aceite: 14/04/2023

Mayra Vargas-Mendieta

Programa de Acuicultura

Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste, S.C.

La Paz, Baja California Sur, México

Luis Daniel Moreno-Figueroa

Grupo de Nanotecnología y

Biocontrol Microbiano

Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste, S.C.

La Paz, Baja California Sur, México

<https://orcid.org/0000-0002-5227-7824>

Humberto Villarreal-Colmenares

Programa de Acuicultura

Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste, S.C.

La Paz, Baja California Sur, México

<https://orcid.org/0000-0002-4125-8871>

Alfredo Hernández-Llamas

Programa de Acuicultura

Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste, S.C.

La Paz, Baja California Sur, México

<https://orcid.org/0000-0001-6369-6963>

José Naranjo-Páramo

Programa de Acuicultura

Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste, S.C.

La Paz, Baja California Sur, México

RESUMEN: Se desarrolló un análisis bioeconómico para inferir la producción y rendimiento económico del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en un sistema intensivo foto-heterotrófico en alta salinidad con reposición mínima de agua para el ciclo verano-otoño. La salinidad fue mantenida en 46 (± 2.5) g/L, oxígeno disuelto a 4.4 (± 0.4) mg/L, pH a 7.8 (± 0.2) y temperatura a 31.6 (± 0.7) °C. El modelo bioeconómico mostró un peso individual final (*wf*) fue de 18.14 g, sobrevivencia de 81.4% y una biomasa final de 17.73 Ton/ha, valores muy cercanos a los registrados en la biometría final (18.6 g para el peso, 81.2% para la sobrevivencia y 18.1 Ton/ha para la biomasa), con una utilidad neta de \$693,730 MXN/ha en 92 días de cultivo. El análisis de sensibilidad mostró que el precio de camarón fue el factor que más influenció la utilidad neta, seguido del peso final, concentración de oxígeno disuelto y temperatura. El cultivo intensivo foto-heterotrófico en alta salinidad es una innovadora tecnología que permite obtener elevados rendimientos de producción de camarón de manera biosegura. Los resultados económicos indican un alto potencial de aplicación y la conveniencia de continuar la investigación para su escalamiento.

PALABRAS CLAVE: Cultivo intensivo bioseguro. Foto-heterotrófico. Camarón blanco.

BIOECONOMIC ANALYSIS OF THE INTENSIVE PRODUCTION OF WHITE LEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) IN A PHOTO-HETEROTROPHIC HYPERSALINE SYSTEM WITH MINIMAL SEAWATER REPLACEMENT, FOR THE SUMMER-AUTUMN CYCLE

ABSTRACT: A bioeconomic analysis was developed to infer the production and economic performance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in a photo-heterotrophic, hypersaline intensive system with minimal water replacement for the summer-autumn production cycle. Salinity was maintained at 46 (± 2.5 g / L), dissolved oxygen at 4.4 (± 0.4 mg / L), PH at 7.8 (± 0.2) and temperature at 31.6 (± 0.7 ° C). The bioeconomic model showed that final individual weight (w_f) was 18.14 g, survival was 81.4% and final biomass of 17.73 Ton / ha. These values very close to those registered at harvest (18.6 g for the final weight, 81.2% for survival and 18.1 Ton / ha for final biomass). Net profit was \$ 693,730 MXN / ha after 92 days of rearing. The sensitivity analysis showed that the price of shrimp was the factor that most influenced the net profit, followed by the final weight, dissolved oxygen concentration and temperature. The intensive photo-heterotrophic system is an innovative technology that allows to obtain high yields of shrimp production in a biosecure way. The economic results indicate a high potential for application and the convenience of continuing the investigation for its scaling up.

KEYWORDS: Intensive biosecure cultivation. Photo-heterotrophic. White leg shrimp.

1 INTRODUCCIÓN

La camaronicultura, a pesar de sus innegables beneficios como son la creación de empleos, la obtención de divisas para los países en desarrollo y de ganancias económicas para las empresas dedicadas a la actividad, es una industria que enfrenta grandes retos y problemáticas. Entre ellos, los de mayor importancia se relacionan con el impacto ambiental de los efluentes sobre los ecosistemas receptores de las descargas, la aparición frecuente de epizootias y la dependencia de insumos de origen animal, especialmente de peces marinos, para la fabricación de alimentos balanceados. Para enfrentar dichos retos, las nuevas tecnologías de cultivo requieren la sustentabilidad, tanto ambiental como económica, proporcionando organismos con alta calidad nutricional y organoléptica. La tendencia acuícola mundial busca la intensificación, ya que existe una competencia creciente por espacios y recursos con otras industrias, aunado a la necesidad de disminuir costos de producción para incrementar el margen de ganancia y la competitividad.

El sistema foto-heterotrófico es un sistema híbrido también llamado semi-biofloc y/o mixotrófico, que nace del sistema heterotrófico (biofloc) adaptando el protocolo a las características locales geográficas y de infraestructura. Está basado en un cuidadoso equilibrio entre organismos heterotróficos y autotróficos que se presenta cuando

existe un balance en los nutrientes suministrados, la concentración de oxígeno disuelto adecuada y la capacidad de transporte de partículas necesaria, resultado del uso de aireación. Los microorganismos crean un agregado formado por algas verdes, bacterias, detritos, partículas orgánicas y protozoarios, que además de ser utilizado como alimento, limita el desarrollo de bacterias patógenas (ej. *Vibrio spp.*), controla la calidad del agua al degradar compuestos nitrogenados (NH_4 , NO_3 , NO_2), alimento no consumido, plancton muerto y heces fecales en compuestos no tóxicos, lo que conlleva a la estabilización, permitiendo que el recambio de agua sea innecesario si los demás parámetros son controlados correctamente (Huda *et al.*, 2013; Moreno-Figueroa *et al.*, 2019). El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento biológico y económico de esta tecnología a través de un análisis bioeconómico.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Seis estanques de 1000m² (20 x 50m) a una profundidad de 1.35m fueron sembrados a una densidad de 120 PL/m², alimentados 3 veces por día con ración comercial de 35% de proteína cruda. Rutinariamente se monitorearon y analizaron parámetros de calidad de agua (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, amonio, nitritos, nitratos, fosfatos, concentración de bacterias del género *Vibrio* y heterótrofas marinas). Aireadores (Aire-O₂) de 2HP se utilizaron para ofrecer el equivalente a 20 HP/ha de aireación durante los primeros 60 días de cultivo, incrementando a 40 HP/ha hasta finalizar el ciclo en el día 92. La salinidad se mantuvo en 46 ± 2.5 g/L con adiciones semanales de agua marina, equivalentes a 1.6%/ día.

El modelo bioeconómico está integrado por tres submodelos: biológico, de manejo (factor de conversión alimenticia) y económico. El modelo fue calibrado a partir de los resultados zootécnicos y de calidad de agua de los estanques registrados a lo largo del ciclo. El submodelo biológico fue utilizado para predecir la cantidad de biomasa (b_t) en función del tiempo, como el resultado del producto del peso individual promedio (w_t) y el número de organismos sobrevivientes (n_t): $b_t = w_t \cdot n_t$. Se usó la ecuación desarrollada por Ruiz-Velazco *et al.* (2010) para predecir el crecimiento del camarón: $w_t = w_i + (w_f - w_i)[(1 - k_i) / (1 - k^h)]^3 + e$; donde: w_t es el peso promedio individual a t unidades de tiempo, w_i es el peso inicial, w_f es el peso final, k es el coeficiente de crecimiento, h es el número de unidades de tiempo hasta la cosecha y e es el error residual.

La sobrevivencia fue calculada en función del tiempo, usando la ecuación exponencial: $n_t = n_0 e^{-z \cdot t}$; donde: n_t es el número de sobrevivientes, n_0 es el número de organismos en la siembra, t es el tiempo y z es la tasa de mortalidad, calculada de la

siguiente manera: $z = -Ln(n_t/n_0)/tf$; dónde: n_t es el número de organismos al momento de la cosecha (tf). Se usaron procedimientos para regresión no lineal disponibles en Statistica 6.0 para ajustar la ecuación de crecimiento, estableciendo un nivel de significación de $P < 0.05$. Se llevaron a cabo análisis para determinar correlaciones entre los parámetros del sub-modelo biológico y las variables de calidad de agua.

Para el submodelo de manejo, el factor de conversión alimenticia (FCA) fue inferido en función del tiempo, combinando una ecuación lineal simple con una curva senoide, mediante la siguiente fórmula: $FCA = A + (B \cdot t) + C \cdot \text{Sen}(2 \cdot \pi \cdot t / L) + F + e$; dónde: A y B son coeficientes de la ecuación lineal, C , D , L y F son parámetros de la curva senoide, t es el tiempo y e es el error residual resultante del análisis de regresión. En el caso del submodelo económico, la utilidad (u_t) se calculó en función del tiempo: $u_t = i_t - c_t$; dónde: el ingreso (i_t) es el producto de la biomasa del camarón (del submodelo biológico) y el precio de venta del camarón (pv) y c_t son los costos operativos considerados para el análisis: $c_t = c_{per} + c_{PL} + c_{fer} + c_{pe} + c_{ma} + cc + c_{A_t} + c_{p_t} + c_{ra_t} + c_{e_t}$; dónde los costos son: c_{per} , personal (incluyendo costos administrativos); c_{PL} , postlarva; c_{fer} , fertilizante; c_{pe} , preparación del estanque; c_{ma} , mantenimiento; cc , cosecha; c_{a_t} , alimento; c_{p_t} , probióticos; c_{ra_t} , reemplazo de agua y c_{e_t} energía eléctrica.

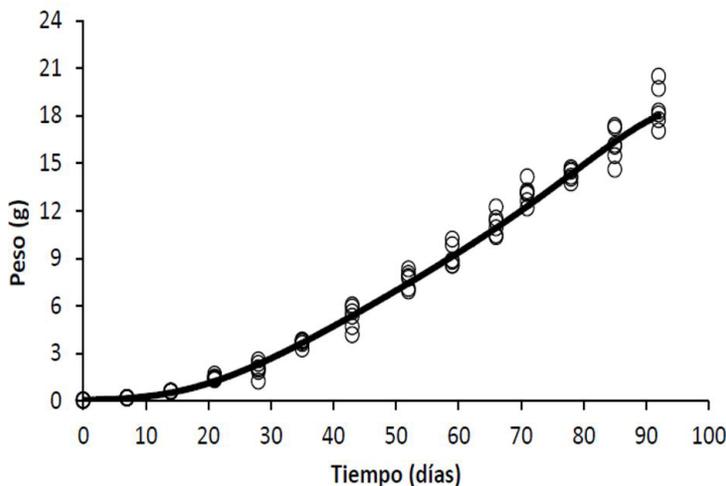
La normalidad en los datos de crecimiento de los estanques se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se comparó con la prueba análisis de varianza de una vía. El modelo bioeconómico se programó en Excel 10.0 y para los análisis se utilizó Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), estableciendo una significación de $P < 0.05$. Se llevaron a cabo simulaciones Monte Carlo con @Risk 6.0 (Palisade, Ithaca, N.Y.), a fin de generar variabilidad estocástica en los valores de la producción y de la utilidad neta utilizando las distribuciones de probabilidad para cada uno de los submodelos. El coeficiente de variación se usó como un índice de incertidumbre del desempeño económico. Para analizar la sensibilidad de las utilidades a factores de riesgo, se utilizaron valores de los coeficientes de regresión múltiple, los cuales relacionan la utilidad neta con los respectivos parámetros zootécnicos y económicos. De acuerdo con esto, un valor alto del coeficiente, indica un alto impacto (sensibilidad) de la variable o parámetro correspondiente en los ingresos netos. Para el análisis de sensibilidad se utilizaron los procedimientos disponibles en @Risk 6.0.

3 RESULTADOS

La ecuación de crecimiento analizada se ajustó adecuadamente a los datos previamente registrados y se obtuvieron resultados significativos en términos del análisis

de varianza de la regresión (Fig. 1). Se estimó que el peso individual final (w_f) debería estar entre 16.72 y 19.16 g, con un promedio de 18.14 g. Con el mismo porcentaje de confianza se estimó que la sobrevivencia debería estar entre 80.3 y 83.9%, promediando 81.4% y una biomasa final entre 16.81 y 18.59 Ton/ha, con un promedio de 17.73 Ton/ha, valores muy cercanos a los registrados en la base de datos (18.6 g para el peso final, 81.2% para la sobrevivencia y 18.1 Ton/ha para la biomasa final).

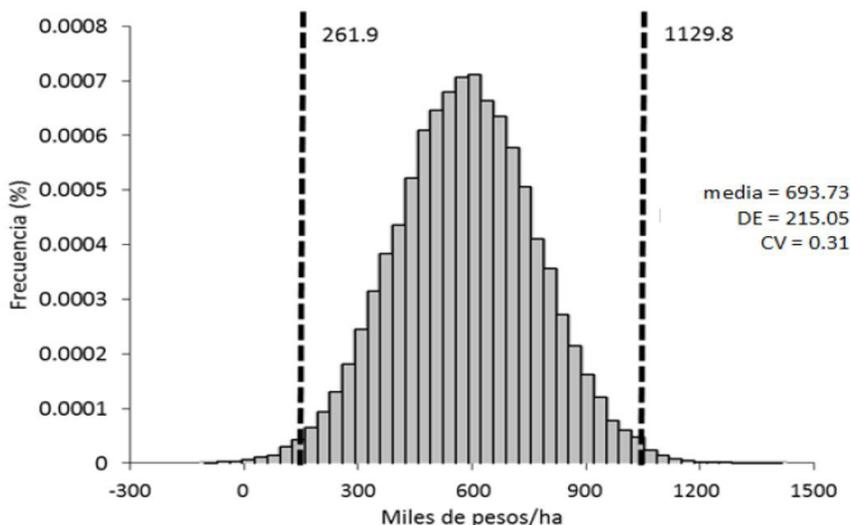
Figura 1. Ajuste de la ecuación del submodelo de crecimiento: $w_t = w_i + (w_f - w_i)[(1 - k)^t / (1 - k^t)]^3$ al peso de *L. vananmei* durante el ciclo de producción verano-otoño.



Los resultados mostraron que el coeficiente de crecimiento (k) está negativamente relacionado con la temperatura del agua (T) ($r^2 = 0.93$) y que el peso final (w_f) está directamente relacionado con la concentración de oxígeno disuelto (OD) ($r_2 = 0.92$) y con la tasa de mortalidad (z) ($r^2 = 0.92$). Las relaciones establecidas entre ellos son: $k = 1.3139 - 0.0105 (T)$ y $w_f = 1.0891 + (3321.069 \cdot z) + (2.2626 \cdot DO)$. La ecuación resultante para el cálculo del factor de conversión alimenticia fue: $FCA = 0.9209 + (0.0077 \cdot t) - 0.0413 \cdot Sen(2\pi t / 38.2618) + 6.9397$.

La distribución de probabilidad de la utilidad se muestra en la Fig.2. Se estimó que se obtendrá una utilidad entre \$261,900 y \$1,129,800 MXN/ha (promedio = \$693,730 MXN/ha). De acuerdo con el análisis, los precios del camarón para las tallas de cosecha fueron los factores que más influyeron en la variabilidad de la utilidad, mientras que los parámetros de producción, de calidad del agua y el costo de la postlarva tuvieron influencia media o nula.

Figura 2. Distribución de probabilidad de la utilidad neta del modelo bioeconómico para el cultivo intensivo foto heterotrófico de *L. vannamei* durante el ciclo verano-otoño. Las líneas punteadas indican un intervalo de 95% de confianza.



4 DISCUSIÓN

El modelo biológico predijo satisfactoriamente la dinámica de la producción del camarón, como consecuencia del ajuste adecuado de las ecuaciones de crecimiento y sobrevivencia, así como de los modelos estadísticos resultantes del análisis de regresión. Las relaciones entre los parámetros del modelo de producción y la calidad de agua fueron consistentes con lo reportado por otros autores en lo relativo a la influencia que tiene la temperatura y el oxígeno disuelto en el crecimiento y sobrevivencia. El peso final del camarón (w_f) estuvo positivamente relacionado con la tasa de mortandad (z) y la concentración de oxígeno disuelto (OD). Una mayor tasa de mortandad significó una menor concentración de organismos, lo que facilitó un mayor crecimiento individual de los sobrevivientes, al haber mayor disponibilidad de espacio y recursos. El resultado del modelo estocástico mostró que, con el paso del tiempo, el coeficiente de variación disminuyó indicando que hay menor incertidumbre al predecir el valor de la biomasa hacia el final del ciclo.

Las granjas semi-intensivas en México, generan utilidades entre \$13 000 y \$45 000 MXN/ha/ciclo, mientras que para esta investigación, se estimó que la utilidad promedio fue de \$693 730/ha. El sistema evaluado presenta beneficios en bioseguridad, consistencia productiva y en la reducción de requerimientos de área productiva; sin embargo, son necesarias futuras investigaciones para demostrar la factibilidad del

sistema, tomando en cuenta costos de inversión e impuestos, entre otras variables. El análisis de sensibilidad mostró que el precio del camarón fue el factor más importante en la variabilidad de la utilidad neta, en estudios anteriores, se indicó que es un factor muy importante en la determinación del rendimiento económico en granjas semi-intensivas e intensivas (Hernández-Llamas *et al.* 2013, Estrada-Pérez *et al.* 2015; Moreno-Figueroa *et al.*, 2019).

El precio base del camarón es principalmente determinado por comerciantes que acaparan la mayor parte de la producción y la mejor estrategia para la cosecha, posiblemente deberá cambiar año con año, dependiendo de cambios en los precios determinados por la demanda de tallas específicas y la aparición de brotes de enfermedades, entre otros factores.

5 CONCLUSIÓN

El modelo de producción foto heterotrófico para camarón es altamente eficiente y muestra viabilidad económica. La relevancia del precio del camarón para diseñar programas y/o protocolos de cultivo, hace imperativo el seguimiento y registros semanales en los precios del camarón, en vez de los actuales que se realizan mensual o trimestralmente. El modelo bioeconómico resultó una herramienta efectiva para analizar el rendimiento económico y factores de incertidumbre en los sistemas de cultivo de camarón.

BIBLIOGRAFÍA

Estrada-Pérez, M., Ruiz-Velazco, J.M.J., Hernández-Llamas, A., Zavala-Leal, I., Martínez-Cárdenas, L. (2015). Deterministic and stochastic models for analysis of partial harvesting strategies and improvement of intensive commercial production of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquacultural Engineering*, 70, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.11.003>

Hernández-Llamas, A., Ruiz-Velazco, J.M.J., Gómez-Muñoz, V.M. (2013). Economic risk associated with white-spot disease and stochastic variability in economic, zootechnical and water quality parameters for intensive production of *Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Aquaculture*, 5, 121-131. <https://doi.org/10.1111/raq.12008>

Huda, A.S., Ispinanto, J., Bahri, F., Decamp, O. (2013). Successful production in semi-biofloc in Indonesia. *Aquaculture Asia Pacific*, 2, 8-12. <https://thefishsite.com/articles/successful-production-in-semibiofloc-in-indonesia>

Moreno-Figueroa, L.D., Villarreal-Colmenares, H., Naranjo-Páramo, J., Vargas-Mendieta, M., Mercier, L., Casillas-Hernández, R., Hernández-Llamas, A. (2019). Bioeconomic modelling of the intensive production of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a photo-heterotrophic hypersaline system, with minimal seawater replacement. *Reviews in Aquaculture* 11: 685-696. <https://doi.org/10.1111/raq.12252>.

Ruiz-Velazco, J.M.J., Hernández-Llamas, A., Gómez-Muñoz, V.M., Magallón, F.J. (2010). Dynamics of intensive production of shrimp *Litopenaeus vannamei* affected by White-spot disease. *Aquaculture*, 300, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.027>.

CAPÍTULO 9

¿CÓMO VA EL CAMBIO DE ESTATUS DE LOS CULTIVOS/ALIMENTOS NUS EN CULTIVOS/ALIMENTOS NO-NUS?

Data de submissão: 26/04/2023

Data de aceite: 12/05/2023

Ximena Rocío Cadima Fuentes

Fundación PROINPA

Programa de Agrobiodiversidad y

Cambio Climático

Cochabamba – Bolivia

<https://orcid.org/0000-0002-5244-774X>

RESUMEN: En Latinoamérica tenemos un gran grupo de “cultivos menores” catalogados como especies olvidadas y/o subutilizadas (NUS por su acrónimo en inglés) porque tienen un valor inferior al de los cultivos de primera necesidad en lo referente a producción y a valor mercantil. Reciben muy poca atención de los sectores nacionales de la política, la investigación y el desarrollo relacionados con la agricultura y la conservación de la biodiversidad, aunque tienen una gran importancia local en los sistemas de consumo y de producción. En los últimos años, desde diferentes frentes se hicieron esfuerzos importantes en la revalorización de las NUS, todo con el propósito de cambiar el estatus de NUS en no NUS, es decir en cambiar la situación de riesgo de pérdida o extinción de estos cultivos menores. En este documento se exponen, a través de los resultados de

un sondeo rápido de consumidores urbanos de Argentina, Bolivia, Colombia y Perú, si los esfuerzos regionales, nacionales e internacionales de mejorar el estatus de las NUS son suficientes para hacer realidad la promesa de las NUS en su contribución a la diversificación agroalimentaria y económica de los países. El ejercicio permitió detectar i) diferencias en la catalogación de cultivos NUS (algunos cultivos son considerados NUS en un lugar/país pero no en otro), ii) más del 60% de los registros de frecuencia de consumo mostraron que los alimentos NUS fueron apenas probados entre 2 veces al año a una sola vez en la vida, iii) limitado conocimiento de los usuarios de formas de consumo de cultivos/alimentos NUS. Estas apreciaciones indican que las estrategias de conservación de las NUS deben incluir una promoción agresiva (y responsable) de consumo, pues está en manos de todos, incluidos los ciudadanos a pie, ser parte de la conservación a través del consumo y uso de estos cultivos.

PALABRAS CLAVE: Cultivos subutilizados. Sondeo rápido. Frecuencia y formas de consumo.

HOW IS THE CHANGE OF THE STATUS OF NUS CROPS/FOOD IN NON-NUS CROPS/FOOD GOING?

ABSTRACT: In Latin America we have a large group of “minor crops” classified as forgotten

and/or underutilized species (NUS) because they have a lower value than staple crops in terms of production and market value. These species receive very little attention from policy, research and development national sectors related to agriculture and biodiversity conservation, although they have huge local importance in consumption and production systems. In recent years, from different fronts, important efforts have been made to revalue NUS, all with the purpose of changing the status of NUS to non-NUS, that is, to change the risk situation of loss or extinction of these minor crops. This document exposes, through the results of a quick survey of urban consumers in Argentina, Bolivia, Colombia and Peru, whether the regional, national and international efforts to improve the status of the NUS are sufficient, that is to say that the NUS are contributing significantly to the agri-food and economic diversification of the countries. The exercise allowed us to detect i) differences in the classification of NUS crops (some crops are considered NUS in one place/country but not in another), ii) more than 60% of the frequency of consumption records showed that NUS foods were barely tested between 2 times a year to once in a lifetime, iii) limited knowledge in forms of consumption of NUS crops/food. These appreciations indicate that the conservation strategies of the NUS must include an aggressive (and responsible) promotion of consumption, since it is in the hands of everyone, including ordinary citizens, to be part of the conservation strategies through the consumption and use of these crops.

KEYWORDS: Underutilized crops. Quick survey. Frequency and forms of consumption.

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente se estiman 383.671 especies de plantas vasculares en el mundo (Nic Lughadha *et al.*, 2016; Ulloa Ulloa *et al.*, 2017), de las cuales alrededor de 30.000 son plantas comestibles, de ellas alrededor de 7.000 son cultivadas o utilizadas por el humano como alimento, pero solo 30 proporcionan el 95% de la energía alimentaria mundial y cuatro de estos (arroz, trigo, maíz y papa) representan el 60% del suministro de energía humano (FAO, 2015; Padulosi *et al.*, 2013).

Estos números demuestran que una gran parte de las fuentes potenciales de alimentos es subutilizada. Una gran cantidad de especies y variedades vegetales que fueron cultivadas en otras épocas, por diversas razones, están hoy olvidadas. Algunas especies y variedades eventualmente son utilizadas en algunos países, territorios o culturas pero de forma muy localizada. La FAO ha registrado más de 1000 especies olvidadas o subutilizadas en INFOODs (FAO, 2018).

Latinoamérica particularmente es muy rica en diversidad de especies y cultivos por la gran diversidad de zonas agroecológicas que posee. La región andina es uno de los centros de diversidad y domesticación de cultivos, identificado por Vavilov (Vavilov, 1926; Vavilov, 1992). Algunos de los cultivos de esta región tienen un alcance y relevancia mundial como la papa y el maíz, pero una gran mayoría de los cultivos nativos todavía

pueden encontrarse bajo sistemas tradicionales de producción. Estas son las especies olvidadas y/o subutilizadas (NUS por su acrónimo en inglés) o también llamados “cultivos menores” porque tienen un valor inferior al de los cultivos de primera necesidad en lo referente a producción y a valor mercantil (National Research Council 1989). Han sido relegados por otros cultivos y variedades comerciales, y reciben muy poca atención de los sectores nacionales de la política, la investigación y el desarrollo relacionados con la agricultura y la conservación de la biodiversidad, factores de riesgo que están conduciendo a la pérdida de estos recursos genéticos.

Desde varios ámbitos, particularmente la academia y organismos internacionales van continuamente alertando sobre los riesgos que corren las NUS, y toda la población científica académica queda consternada por la situación. En los últimos años, desde diferentes frentes se hicieron esfuerzos importantes en la identificación de las NUS, su estudio, estado de arte, exploración de sus potencialidades para diferentes usos, hasta el mercado. Se llevaron a cabo eventos internacionales en diferentes países y continentes¹ para tratar el tema involucrando la participación de diversas organizaciones internacionales². Todo con el propósito de cambiar el estatus de NUS en no NUS, es decir en cambiar la situación de riesgo de pérdida o extinción de estos cultivos menores. ¿Pero todas estas acciones están siendo realmente efectivas para cambiar ese estatus?, ¿La comunidad científica y académica con toda la información que generan sobre las NUS están llegando efectivamente a los responsables para cambiar el estatus de estos cultivos?, ¿quiénes son responsables para este lograr este cambio? ¿Cómo se involucra el ciudadano de a pie para ser parte de este esfuerzo colectivo?

En este estudio se involucraron a consumidores urbanos para detectar a través de sus hábitos alimenticios, si los esfuerzos regionales, nacionales e internacionales de mejorar el estatus de las NUS son suficientes para hacer realidad la promesa de las NUS en su contribución a la diversificación agroalimentaria y económica de los países.

2 METODOLOGÍA

Mediante un sondeo rápido con un grupo de profesionales y estudiantes de Argentina, Bolivia, Colombia y Perú sensibilizados sobre las NUS³, se detectó primero

¹ Chennai 2005, Arusha 2008, Suwon 2010, Kuala Lumpur 2011, Córdoba 2012, Accra 2013.

² **Bioversity International**, el Fondo Internacional para el Desarrollo Agrícola (**FIDA**), el Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (**CTA**), el Ministerio Federal para la Cooperación Económica y el Desarrollo de Alemania (**BMZ**); la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (**GIZ**); la FAO, la Unión Europea (**UE**), el Programa de Investigación del CGIAR sobre Cambio Climático, Agricultura y Seguridad Alimentaria (**CCAFS**), Centro Mundial de Agrosilvicultura (**ICRAF**), el Programa de Investigación del CGIAR sobre Políticas, Instituciones y Mercados.

³ 13 participantes del Curso virtual “Saberes y tradiciones de plantas subutilizadas en la zona andina”. Red CULTIVA CYTED. Marzo 2021.

su percepción sobre los cultivos NUS en su país o región donde viven, y a través de ellos se hizo un sondeo en el ámbito familiar (consumidores urbanos) sobre las frecuencias y formas de consumo de cultivos/alimentos NUS. Se les proporcionó un listado de 38 cultivos con los diferentes nombres que son conocidos en la región andina (Cuadro 1). El listado se construyó en base a la lista de cultivos reportados como subutilizados por expertos en recursos genéticos de Latinoamérica de acuerdo a Galluzi & López-Noriega (2014). En el caso de la papa, se especificó la “papa nativa” (*Solanum andigenum*) que es diferente a la papa común (*Solanum tuberosum*); lo propio con la quinua (*Chenopodium quinoa*), se especificó “quinuas de colores” para diferenciar de la quinua comercial que ya no es considerada NUS (Galluzi & López-Noriega, 2014). En el caso del ají, se especificaron dos tipos silvestres, ulupica (*Capsicum cardenasii*, *C. eximium*) y arivivi (*Capsicum baccatum* var *baccatum*) que son diferentes al ají comercial, el cual ya no es considerado NUS (Galluzi & López-Noriega, 2014). En el listado se mantuvieron la yuca (*Manihot esculenta*) y el camote (*Ipomoea batatas*), que aunque ya no son calificados NUS de acuerdo a Galluzi & López-Noriega (2014), todavía son limitadamente consumidos en regiones andinas altas.

Un total de 105 personas fueron encuestadas utilizando formularios. Se consultó si los productos reconocidos por ellos, fueron consumidos, en qué forma y en qué frecuencia a través de preguntas orientadoras (Cuadro 2).

Cuadro 1. Lista de cultivos o alimentos subutilizados en la región andina.

Nombre común	Nombre científico
Papa nativa (qoyllu, wayku, negra, qati, etc)	<i>Solanum andigenum</i>
Oca	<i>Oxalis tuberosa</i>
Papalisa, ullucu, melloco	<i>Ullucus tuberosus</i>
Isaño, mashua	<i>Tropaeolum tuberosum</i>
Quinua de colores (negra, roja, café)	<i>Chenopodium quinoa</i>
Cañahua, cañihua	<i>Chenopodium pallidicaule</i>
Amaranto, kiwicha	<i>Amaranthus caudatus</i>
Arracacha, racacha	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>
Yacón	<i>Smallanthus sonchifolius</i>
Achira	<i>Canna edulis</i>
Walusa, malanga, quequisque, papa china	<i>Xanthosoma</i> spp.
Ají ulupica	<i>Capsicum cardenasii</i> , <i>C. eximium</i>
Ají arivivi	<i>Capsicum baccatum</i> var <i>baccatum</i>

Nombre común	Nombre científico
Tomate de árbol, tomate extranjero	<i>Cyphomandra betacea</i>
Chirimoya, chirimoyo	<i>Annona cherimola</i>
Guanábana	<i>Annona muricata</i>
Pacay, guaba	<i>Inga feuillei</i>
Camote, patata dulce	<i>Ipomoea batatas</i>
Kopuro, frijol reventón, frijol de altura	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Tarwi, tauri, chuchusmuti, chocho	<i>Lupinus mutabilis</i>
Yuca	<i>Manihot esculenta</i>
Jamachipeke	<i>Maranta arundinacea</i>
Camu camu	<i>Myrciaria dubia</i>
Tuna	<i>Opuntia ficus indica</i>
Ajipa	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
Granadilla	<i>Passiflora ligularis</i>
Tumbo, taxo	<i>Passiflora mollisima</i>
Aguaymanto, uchuva, uvilla	<i>Physalis peruviana</i>
Verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i>
Guayaba	<i>Psidium guajava</i>
Mora silvestre	<i>Rubus glaucus</i>
Pepino dulce	<i>Solanum muricatum</i>
Lulo, naranjilla	<i>Solanum quitoense</i>
Mortiño	<i>Vaccinium meridionale</i>
Sauco	<i>Sambucus peruviana</i>
Chayote	<i>Sechium edule</i>
Pitajaya	<i>Stenocereus spp</i>
Maca	<i>Lepidium meyenii</i>

Fuente: En base a Galluzi & López-Noriega, (2014).

Cuadro 2. Preguntas orientadoras sobre la forma y frecuencia de consumo de productos o alimentos NUS.

¿Cuál es la forma como Ud. consume o ha consumido los productos identificados?					¿Con qué frecuencia Ud. consume o ha consumido los productos identificados?			
Cocido o preparado	Fresco como fruta	Fresco en ensalada	En refresco	Otra forma	Semanal	1-2 veces al mes	2-4 veces al año	Una sola vez en mi vida

Los datos de los formularios se tabularon en una base de datos para su análisis.

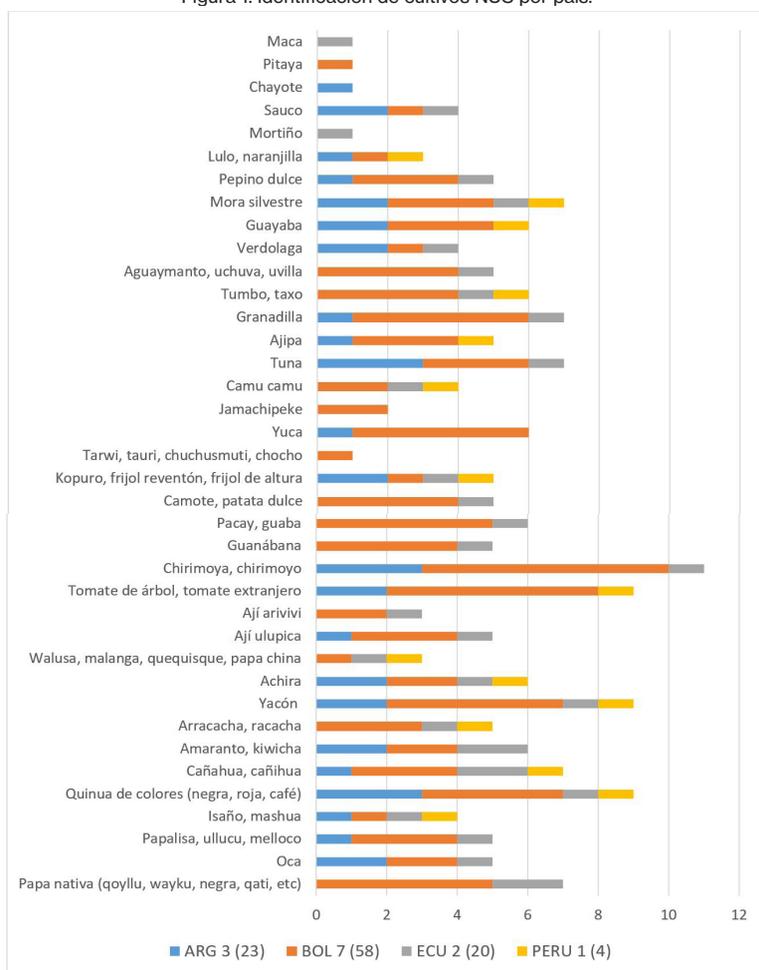
3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 IDENTIFICACIÓN DE CULTIVO O ALIMENTO NUS

Los encuestadores fueron profesionales y estudiantes de áreas relacionadas (agronómicas o biológicas), que pasaron por un proceso de sensibilización de la importancia de los cultivos marginados y subutilizados. Al preguntarles qué cultivos de los 38 listados los consideran NUS, las respuestas fueron muy variables dependiendo de la región de donde provenían. Los de Argentina por ejemplo, fueron todos de la parte norte andina, los de Bolivia fueron de diferentes regiones (altiplano, valles y trópico), y los de Ecuador y Perú fueron de la sierra.

Todos los 38 cultivos listados fueron identificados como NUS por al menos un encuestador (Figura 1).

Figura 1. Identificación de cultivos NUS por país.

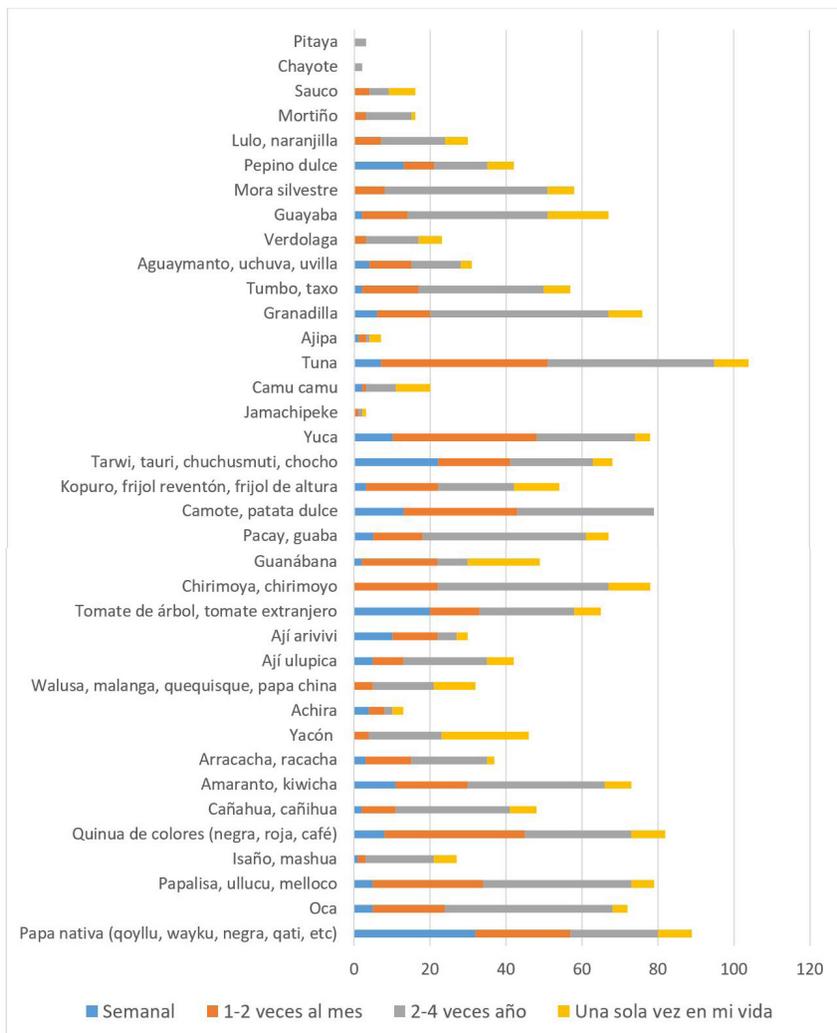


El cultivo más votado como NUS fue el chirimoyo o chirimoya (11/13), seguido por la quinua de colores (9/13), el yacón (9/13), y el tomate de árbol (9/13). La papa nativa, la cañahua, la tuna, la granadilla y la mora silvestre también fueron consideradas NUS por la mayoría (7/13).

Resaltó que otros cultivos poco conocidos no sean votados como NUS, esto fue debido probablemente a que varios de los encuestadores en realidad nunca los escucharon siquiera mencionar.

Es el caso del isaño, la arracacha, la achira, la walusa, el ají arivivi, el jamachipeqe, el camu camu, la uchuva, la verdolaga, el lulo, el mortiño, el sauco, el cayote, la pitajaya y la maca, que resultaron con los datos de frecuencia de consumo más baja (Figura 2).

Figura 2. Frecuencia de consumo como alimento de cultivos NUS.



3.2 FRECUENCIA DE CONSUMO

Los encuestados reportaron 27 cultivos NUS que se consumen semanalmente, 35 los consumidos 1-2 veces por mes, 37 los que se consumen 3-4 veces al año, y 34 los que consumen una sola vez en la vida. Estos datos evidencian que el mismo cultivo fue señalado por los encuestados con diferentes preferencias u oportunidad de adquisición o consumo (semanal, 1-2 veces al mes, 2-4 veces al año, o una sola vez en la vida).

Los cultivos NUS más consumidos (semanal a 1-2 veces mensual) en el ámbito familiar de los encuestadores, fueron la papa nativa, la cañahua, el camote, y la yuca, reportado al menos por el 50% de los que mencionaron consumir estos productos.

Entre los cultivos más mencionados por los encuestados pero que son poco consumidos (2-4 veces al año a una sola vez en la vida) están la chirimoya, granadilla, la guayaba, la tuna, la mora silvestre, el pacay, la oca, la papalisa, el amaranto y el yacón.

Los poco mencionados y también poco consumidos son los indicados líneas arriba (isaño, la arracacha, la achira, la walusa, el ají arivivi, el jamachipeqe, el camu camu, la uchuva, la verdolaga, el lulo, el mortiño, el sauco, el cayote, la pitajaya y la maca).

La tuna es el único cultivo que todos los encuestados mencionaron haber consumido al menos una vez, de hecho 88 veces fue mencionada de haberse consumido entre 1-2 mensual a 2-4 veces al año.

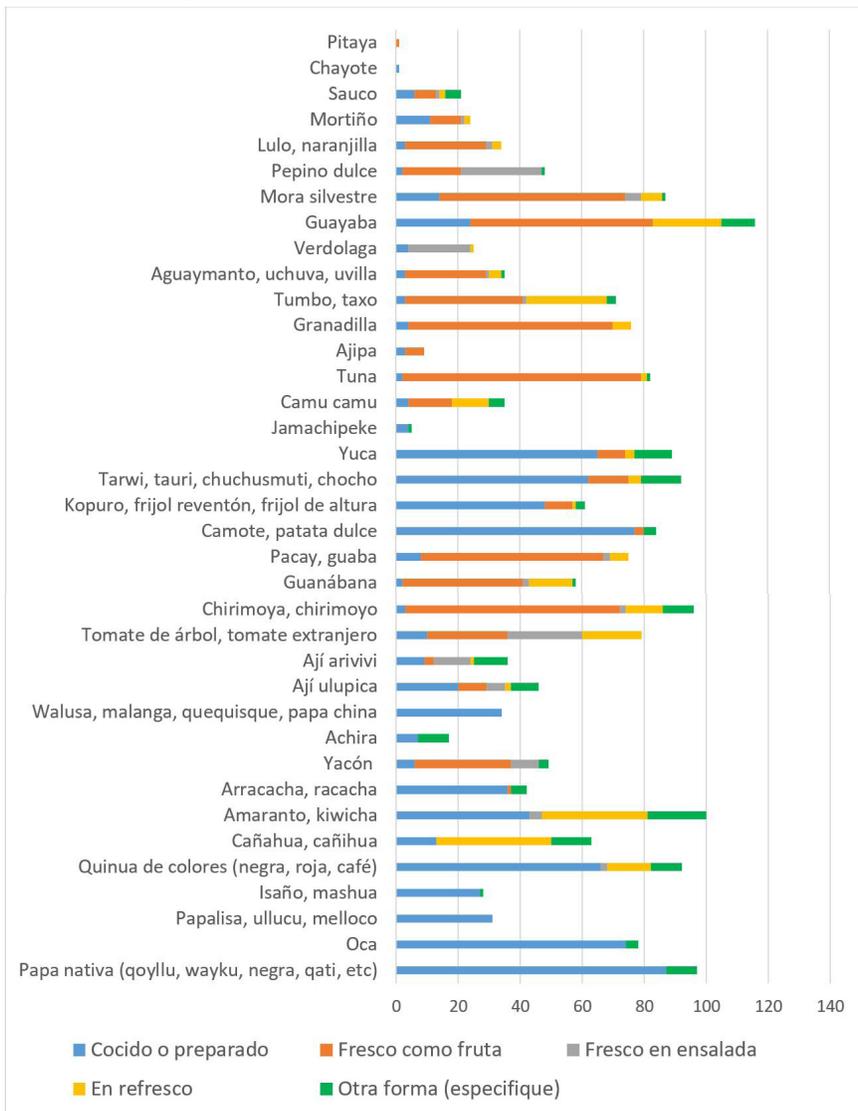
3.3 FORMAS DE CONSUMO

Prácticamente todos los cultivos fueron mencionados de poder consumirse en forma cocida o preparada, incluidas las frutas. Algunos datos resultaron curiosos como por el ejemplo el tarwi que además de cocido o preparado también mencionaron el consumo fresco, probablemente esto se deba al desconocimiento de algunos encuestados de que este producto ya se comercializa cocido. Otro caso fue la quinua de colores o el amaranto que eventualmente se consume en ensaladas pero no necesariamente crudas (la pregunta era fresco en ensalada).

Los tubérculos andinos incluida la papa nativa fueron reportados como los menos versátiles en formas de consumo, lo mismo que el chayote que es una cucúrbita, la pitaya (fruta), la achira y la maca (raíces andinas).

Los cultivos reportados con mayor versatilidad en las formas de consumo (al menos cuatro diferentes formas) fueron la quinua de colores, el amaranto, el ají ulupica, el ají arivivi, el tomate de árbol, la chirimoya, el pacay, el frijol reventón, el tarwi, la yuca, el camu camu, el tumbo, la guayaba, la mora silvestre, el lulo, el mortiño y el sauco. Aunque las veces reportadas fueron limitadas.

Figura 3. Formas de consumo como alimento de cultivos NUS.



Una vez concluido el ejercicio, los encuestadores dieron su opinión sobre los factores que podrían haber influenciado en el **bajo o alto** consumo de los cultivos o productos mencionados por los encuestados. Las respuestas fueron variadas como por ejemplo:

Factores que promueven el consumo:

- Curiosidad de productos producidos en el campo. A algunos consumidores les gusta diversificar con productos “raros” o “nuevos”.

- Herencia. Padres hacían consumir de pequeños a los niños. También llamado “consumo nostalgia” para recordar lo que se consumía en el pasado.
- Edad de las personas (mayores vs jóvenes). Los mayores conocen mayor diversidad y por lo tanto la aprecian.

Factores que no promueven el consumo:

- Temporalidad, época en que se encuentran los cultivos o alimentos NUS disponibles en el mercado es una limitante porque no se pueden adquirir todo el año.
- Falta de información o desconocimiento de las bondades de los cultivos o alimentos no convencionales.
- Pérdida de costumbres. Relacionado con la edad. Los jóvenes tienen mayor preferencia por comidas rápidas.
- Preferencia/predominancia por cultivos/productos más conocidos. Varios de los cultivos NUS no se conocen cómo consumirlos, por lo que cuando aparecen eventualmente en el mercado, los compradores los ignoran.

4 CONCLUSIONES

El ejercicio permitió detectar i) diferencias en la catalogación de cultivos NUS (algunos cultivos son considerados NUS en un lugar/país pero no en otro), ii) más del 60% de los registros de frecuencia de consumo mostraron que los alimentos NUS fueron apenas probados entre 2 veces al año a una sola vez en la vida, iii) limitado conocimiento de los usuarios de formas de consumo de cultivos/alimentos NUS.

Estas apreciaciones son un indicador que las estrategias de conservación de los NUS deben incluir una promoción agresiva (y responsable) de consumo, pues está en manos de todos, desde los gobiernos nacionales y subnacionales, las instituciones académicas y de desarrollo, los propios productores, las escuelas y cada hogar, incluidos los ciudadanos a pie, para ser parte de la conservación a través del consumo y uso de estos cultivos.

“Lo que no se consume, se descarta y se pierde”

REFERENCIAS

FAO (2015). Recursos genéticos y biodiversidad para la alimentación y la agricultura: Un tesoro para el futuro. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en <https://www.fao.org/assets/infographics/FAO-Infographic-CGRFA30-es.pdf> (última consulta 20 enero 2022).

FAO (2018). Neglected and underutilized crops species. Committee on agricultura. Twenty-sixth Session. Disponible en <https://www.fao.org/3/mx479en/mx479en.pdf>.

Galluzi, G.; López-Noriega, I. (2014). Conservation and Use of Genetic Resources of Underutilized Crops in the Americas – A Continental Analysis. *Sustainability* 6: 980-1017.

National Research Council (1989). *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*; National Academy Press: Washington, DC, USA.

Nic Lughadha, E.; Govaerts, R.; Belyaeva, I.; Black, N.; Lindon, H.; Allkin, R.; Magill, R.E.; Nicolson, N. (2016). Counting counts: revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a re-view of other recent estimates. *Phytotaxa* 272: 82–88.

Padulosi, S.; Thompson, J.; Rudebjer P. (2013). Fighting poverty, hunger and malnutrition with neglected and underutilized species (NUS): needs, challenges and the way forward. Bioversity International, Rome.

Ulloa Ulloa, C.; Acevedo-Rodríguez, P.; Beck, S.; Belgrano, M.J.; Bernal, R.; Berry, P.E.; Brako, L.; Celis, M.; Davidse, G.; Forzza, R.C.; Gradstein, S.R.; Hokche, O.; León, B.; León-Yáñez, S.; Magill, R.E.; Neill, D.A.; Nee, M.; Raven, P.H.; Stimmel, H.; Strong, M.T.; Villaseñor, J.L.; Zarucchi, J.L.; Zuloaga, F.O., Jørgensen, P.M. (2017). An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*, 358: 1614–1617.

Vavilov, N.I. (1926) Studies on the origin of cultivated plants. *Russ. Bull. Appl. Bot. Plant Breed*, 14: 245.

Vavilov, N.I. (1992) *Origin and Geography of Cultivated Plants*; Cambridge University Press: Cambridge, UK.

CAPÍTULO 10

DECOMPOSITION OF THE INVASIVE *ACACIA LONGIFOLIA* IN A PERI-URBAN STREAM

Data de submissão: 14/04/2023

Data de aceite: 29/04/2023

Manuela Abelho

Centre for Functional Ecology
Science for People and the Planet
Associate Laboratory TERRA
Polytechnic Institute of Coimbra
Coimbra Agriculture School
Calçada Martim de Freitas, 3000-456
Coimbra, Portugal
<https://orcid.org/0000-0001-7663-3291>

ABSTRACT: Biological invasions are a major threat to biodiversity and ecosystem functioning. Invasion by species of acacia results in dense monospecific stands, eventually excluding other plants. Riparian areas provide streams of organic matter in the form of leaf litter, the major source of carbon, nutrients, and energy for these ecosystems. Invasion of riparian areas by species of acacia is a reality worldwide, but few studies assessed the effect of the invasion on stream ecosystem functioning. This study compared decomposition of leaf litter from *Acacia longifolia*, a prominent invader in Portugal, and from the autochthonous alder (*Alnus glutinosa*), a common riparian tree which, like *A. longifolia*, is also a nitrogen-fixer, in a small

peri-urban stream of Central Portugal. Under regular current velocity, decomposition rates (-k) of alder ranged 0.0351 to 0.0492 day⁻¹ while decomposition rates of acacia were low (0.0083-0.0084 day⁻¹). Under strong current velocity which promoted fragmentation, decomposition rates reached 0.0530 day⁻¹ for alder and 0.0194 day⁻¹ for acacia. Macroinvertebrate colonization, dominated by collector-gatherers, was similar in the species and had no effect on mass loss of acacia. Acacia leaves were recalcitrant; the low mass loss under regular current velocity conditions was due to leaching and to slow microbial decomposition. These results suggest that under a scenario of invasion of the riparian area by *Acacia longifolia*, leaf litter will no longer be the major source of carbon, nutrients, and energy for the stream food webs, thus endangering ecosystem functioning.

KEYWORDS: Acacia. Alder. Ecosystem functioning. Leaf litter. Macroinvertebrates.

DECOMPOSIÇÃO DA INVASORA *ACACIA LONGIFOLIA* NUM RIBEIRO PERI-URBANO

RESUMO: As invasões biológicas constituem uma forte ameaça para a biodiversidade e para o funcionamento dos ecossistemas. A invasão por espécies de acácia resulta em densos grupos monospecíficos, eventualmente excluindo outras plantas. As zonas ripárias providenciam aos ribeiros matéria orgânica sob a forma de folhas mortas, a principal fonte

de carbono, nutrientes e energia desses ecossistemas. A invasão das zonas ripárias por espécies de acácia é uma realidade a nível global, mas poucos estudos avaliaram o efeito da invasão no funcionamento do ecossistema dos ribeiros. Este estudo comparou a decomposição de folhas de *Acacia longifolia*, uma invasora proeminente em Portugal e de amieiro (*Alnus glutinosa*), uma árvore ripária comum que, tal como a acácia, é também fixadora de azoto, num pequeno ribeiro periurbano do centro de Portugal. Sob condições de corrente regular, as taxas de decomposição ($-k$) do amieiro variaram de 0.0351 a 0.0492 dia⁻¹ enquanto as taxas de decomposição da acácia foram baixas (0.0083-0.0084 dia⁻¹). Sob condições de forte corrente que promoveu fragmentação, as taxas de decomposição do amieiro atingiram 0.0530 dia⁻¹ e da acácia 0.0194 dia⁻¹. A colonização por macroinvertebrados, maioritariamente coletores, foi semelhante nas duas espécies e não teve efeito na perda de massa da acácia. As folhas de acácia demonstraram ser recalcitrantes; a baixa perda de massa deveu-se a lixiviação e a lenta decomposição microbiana. Estes resultados sugerem que num cenário de invasão da zona ripária por *Acacia longifolia*, os detritos foliares já não serão a principal fonte de carbono, nutrientes e energia para as cadeias alimentares aquáticas, ameaçando assim o funcionamento do ecossistema.

PALAVRAS-CHAVE: Acácia. Amieiro. Detritos foliares. Funcionamento do ecossistema. Macroinvertebrados.

1 INTRODUCTION

Invasive alien plants can alter ecosystems, reduce biodiversity, and modify ecosystem functions resulting in negative impacts at the social, and economic levels. Among these species, the genus *Acacia* contains the most prominent invaders worldwide but particularly in Mediterranean areas, spreading in all types of ecosystems, from dunes to riparian areas, and threatening ecosystem functions (Souza-Alonso *et al.*, 2017). Acacias are nitrogen-fixing trees which outcompete autochthonous vegetation (Ferreira *et al.*, 2021). Under disturbed conditions, such as forest fires (Lorenzo *et al.*, 2010), the germination of their immense seed bank contributes for the increase in the number of individuals, eventually excluding other plants and creating dense monospecific stands (Marchante *et al.*, 2003, 2015). Riparian ecosystems are particularly vulnerable to invasion by exotic plant species and many riparian ecosystems in Portugal are already heavily invaded, mainly by *Acacia dealbata* but also by *Acacia longifolia* resulting in the decrease of tree species diversity and in increased concentration of nitrogen in water (Pereira & Ferreira, 2022).

Dead leaves from the riparian vegetation are the basis for the aquatic food webs in many streams, which rely on the decomposition of this allochthonous organic matter as a source of energy (Abelho, 2001). The leaves fall into water and are decomposed through the activity of microbial decomposers – mostly aquatic fungi – and by the feeding activity

of detritivore-invertebrates. In temperate zones, this leaf litter is typically composed of a mixture of deciduous species and occurs in autumn (Abelho & Graça, 1998) and aquatic invertebrates synchronize their life cycles with this input of their primary food source (Abelho, 2001).

The replacement of the autochthonous riparian vegetation by exotic species – especially in monoculture - may alter the amount, type, quality, and seasonality of litter inputs, affecting the availability of food for the macroinvertebrate communities and the stream processes (Abelho & Graca, 1996; Pozo et al., 1997; Molinero & Pozo, 2004). The seasonality of litterfall of *Acacia* species is currently unknown in Portugal. Although most acacias are evergreen trees, several studies reported seasonal litterfall of acacia species in the tropics (Carnevale & Lewis, 2001; Barliza & Peláez, 2010; Sugimoto et al., 2013). In Mediterranean zones, Railoun et al. (2021) reported seasonal litterfall for *Acacia mearnsii* in South Africa, with a peak in mid-summer. Thus, the different chemistry of the leaf litter of these invasive species and the different seasonality of the inputs may significantly affect the aquatic food webs and the ability of streams to process leaf litter.

This work compared the decomposition of leaf litter from the invasive *Acacia longifolia* and the autochthonous *Alnus glutinosa*, also a nitrogen-fixing tree, in a peri-urban stream affected by urbanization-related problems. The main objectives were 1) to determine decomposition rates of *Acacia longifolia*, and 2) to assess how the eventual replacement of autochthonous leaf litter (represented by alder) by acacia would affect the ecological functions, already compromised (Isidoro, 2014), of the stream.

2 METHODOLOGY

2.1 STUDY SITE

The experiment was carried out in Ribeira dos Covões (Coimbra, Portugal: 40°13' N, 8°27' W), a 4th order peri-urban stream with a length of 5 km and a drainage area of 6.2 km². The stream is affected by several urban syndrome problems, including hydrological (Ferreira et al., 2016), due to channelization, altered geomorphology of the channel, removal and/or replacement of the natural riparian vegetation, among others, which result in impoverished macroinvertebrate communities and a deficient ecological condition (Isidoro, 2014).

The first experiment (Serra & Abelho, 2018) was carried out in the autumn of 2013 at two sites separated by approximately 800 m which differed in current velocity. The second experiment (Couceiro & Abelho, 2015) was carried out in the spring 2014 in the first site of 2013. On each sampling occasion, measurements of temperature and

conductivity were taken before sampling. After sampling, mean width (at five transects), mean depth (at each margin and the center of each transept), and surface velocity were measured to determine discharge (Table 1).

In the 2013 experiment, the experiment coincided with a period of heavy rain, which increased current velocity and discharge during the whole experiment (Table 1) and resulted in the loss of some experimental bags. On day 28 in site 2, current velocity and discharge reached 1.15 m s^{-1} and $0.62 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ leading to the loss of all remaining bags.

Table 1. Physic-chemical parameters of the study stream during the two study periods (Mean \pm SE).

Experiment	Temperature (°C)	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Depth (cm)	Velocity (m s^{-1})	Discharge ($\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$)
2013 Site 1	14.40 \pm 0.63	331.25 \pm 9.68	13.60 \pm 3.07	0.48 \pm 0.06	0.297 \pm 0.055
2014 Site 2	14.38 \pm 0.72	348.75 \pm 9.00	29.40 \pm 2.17	0.68 \pm 0.16	0.343 \pm 0.093
2014	13.54 \pm 1.08	220.34 \pm 29.90	16.82 \pm 0.95	0.40 \pm 0.02	0.127 \pm 0.013

2.2 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Leaves from acacia (*Acacia longifolia* (Andrews) Willd.) were picked green while leaves of alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) were picked senescent from the trees in Autumn. The leaves were air-dried in the laboratory and weighed in groups (2.005 g \pm 0.008 SE in the experiment of 2013 and 2.486 g \pm 0.001 SE in the experiment of 2014) to form replicate samples of each species. On the day of starting the experiment, the leaves were sprayed with distilled water to soften and avoid damage and enclosed in mesh bags. The bags were tied in groups of two (alder-acacia; experiment 2013) or four (acacia fine mesh - acacia coarse mesh - alder fine mesh – alder coarse mesh; experiment 2014). Three additional samples of each species, correspondent to day 0, were oven-dried (60°C, 72 hours) and weighed to determine humidity. A humidity coefficient for each species (oven-dry mass/air-dry mass) was multiplied by the air-dry mass of each sample to obtain initial oven-dry mass of the experimental samples.

In the experiment of 2013, decomposition was assessed in coarse (5 mm) mesh bags in two sites, with 12 bags of each species per site, and sampling was carried out after 7, 14, 28, and 42 days of immersion in the stream. In the experiment of 2014, decomposition was assessed in fine (0.5 mm) and coarse (5 mm) mesh bags at one site, with a total of 21 bags of each species and mesh size, and sampling was carried out after 2, 9, 16, 30, 48, 58, and 72 days of immersion in the stream.

On day 0 the ropes connecting the bags were tied to structures at the stream margins so that the bags were deployed transversally at the streambed in three transects.

Three groups, one from each transept, were randomly collected on each sampling day and were transported isolated to the laboratory in an icebox.

In the laboratory, the bags were opened, and each leaf was gently washed with tap water over a 0.5 mm screen to detach debris and macroinvertebrates. The leaves were collected, and oven dried as above to obtain the percentage dry mass remaining (final oven-dry mass/initial oven-dry mass*100).

The macroinvertebrates retained by the screen were picked with forceps and stored in 75% alcohol until processing. Identification was carried out to the lowest possible level under a binocular microscope using the key from Tachet et al. (2010). In the experiment of 2014, the individuals in each sample were allocated to pre-weighed small aluminum tins and oven-dried (60°C, 72 hours) to determine dry biomass. The macroinvertebrates were classified into functional feeding groups (shredders, collector-gatherers, collector-filterers, scrapers, or predators) according to Merritt & Cummins (1996) and the community was characterized in terms of abundance, biomass, richness, diversity (H' , Shannon-Wiener diversity index), and proportion of functional feeding groups.

2.3 STATISTICAL ANALYSIS

Percentage dry mass remaining on each sampling day was used to calculate the exponential decay rates ($-k$) of each species in each mesh size: $M_t = M_i * e^{-k}$ where M_t is dry mass remaining at a given time, M_i is initial dry mass, and e is Euler's number or the basis of the natural logarithm.

The slopes of the natural logarithm of dry mass remaining along time were compared with two-factor analysis of covariance (ANCOVA; ZAR, 2010) to test for the effect of species and site (2013 experiment) and for the effect of species and mesh (2014 experiment) on mass loss.

Coarse mesh bags access decomposition due to the activity of microbial decomposers and macroinvertebrates while fine-mesh bags exclude access of macroinvertebrates to the leaves and thus assess decomposition due to microbial activity. Thus, the difference between coarse and fine mesh bags is due to fragmentation, either by the feeding activity of macroinvertebrates or physical abrasion by the stream current.

Analysis of variance (ANOVA; ZAR, 2010) was used to test for the effect of species and site on macroinvertebrate abundance and richness in the 2013 experiment and for the effect of species on macroinvertebrate abundance, richness, and biomass in the 2014 experiment. After testing for parametric assumptions, data from the 2013 experiment

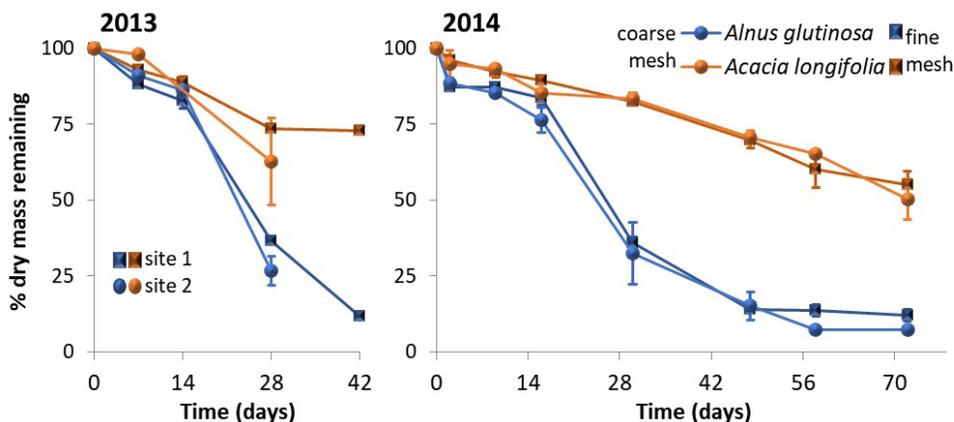
was heteroscedastic (after Levine's test) and was transformed with the square root transformation, $x' = \sqrt{x + 3/8}$ (Zar, 2010).

3 RESULTS

3.1 MASS LOSS AND DECOMPOSITION RATES

In the two experiments, alder lost more mass than acacia, both at the two sites and in the fine and coarse mesh bags (Figure 1), and the difference between the two species started already during the leaching period. In the 2013 experiment, after 7 days, alder had lost $10.5 \pm 0.8\%$ while acacia lost only $5.9 \pm 1.7\%$ of the initial mass. By day 21 alder had already lost 50% of initial mass at both sites while acacia reached the end of the experiment with 63 and 77% of initial mass remaining, respectively in site 1 and in site 2 (Figure 1, left). In the 2014 experiment, on day 2 alder had lost $12.0 \pm 0.5\%$ while acacia lost only $4.7 \pm 2.5\%$ of initial mass. By day 28, alder had already lost more than 50% of initial mass both in fine and coarse mesh bags while by day 72, acacia still had 50% and 55% of dry mass remaining in coarse and fine mesh bags, respectively (Figure 1, right).

Figure 1. Dry mass remaining (mean \pm SE) of alder and acacia leaf litter in the two sites of the 2013 experiment (left) and in the fine and coarse mesh bags of the 2014 experiment (right).



Accordingly, decomposition rates were significantly faster for alder than for acacia (Table 2). In the 2013 experiment, breakdown rates of alder were faster than breakdown rates of acacia in site 1 (Table 2). There was no significant effect of site and no interaction between the factors ($F_{1,39} = 0.41, p = 0.52$). In the 2014 experiment, there was no significant difference in the decomposition rate of fine and coarse mesh bags of each species and no interaction between the factors ($F_{1,87} = 0.02, p = 0.94$). There was no effect of fragmentation on mass loss of acacia, i.e., decomposition rates were equal in coarse and fine mesh bags and the effect on mass loss of alder was low ($-k = 0.0064 \text{ day}^{-1}$).

Table 2 Decomposition rates ($-k \text{ day}^{-1}$) and 95% confidence limits (CL) of alder and acacia leaf litter in the two sites of the 2013 experiment and in the fine and coarse mesh bags of the 2014 experiment. Decomposition rates with the same superscript letter are not significantly different after Tukey test. ns: nonsignificant regression.

					ANOVA	
Species	Site/mesh	N	$-k \text{ day}^{-1} \pm 95\% \text{ CL}$	Species effect	Site/mesh effect	
2013	Alder	Site 1	13	0.0530 ± 0.0111^a	$F_{1,39} = 7.70$ $p < 0.05$	$F_{1,39} = 0.23$ $p = 0.63$
		Site 2	12	0.0492 ± 0.0171^a		
	Acacia	Site 1	11	0.0083 ± 0.0019^b		
		Site 2	7	ns 0.0195 ± 0.0217^a		
2014	Alder	Fine	22	0.0351 ± 0.0044^a	$F_{1,87} = 17.31$ $p < 0.001$	$F_{1,87} = 0.01$ $p = 0.91$
		Coarse	22	0.0415 ± 0.0059^a		
	Acacia	Fine	23	0.0084 ± 0.0014^b		
		Coarse	24	0.0084 ± 0.0017^b		

3.2 MACROINVERTEBRATE COLONIZATION

Macroinvertebrate colonization was similar in alder and acacia leaf litter (Table 3). In the experiment of 2013, there were oscillations in colonization due to the floods; peak colonization at site 1 was achieved on day 42 for both species while on site 2 colonization of alder increased until the end of the experiment and colonization of acacia peaked on day 7 decreasing afterwards (Figure 2, left). There was a significantly higher colonization of both species in site 1 than in site 2 (Table 3; Figure 2, left). In the experiment of 2014, peak colonization of both species occurred on day 9 for biomass and on day 16 for abundance (Figure 2, right) decreasing steeply afterwards. Richness and diversity per sampling day were also similar in the two leaf species (Figure 3, left). The macroinvertebrate community was dominated by collector-gatherers in both species, although the proportions changed between sites and between the two experiments (Figure 3, right).

Table 3 Results of the ANOVA comparing the effect of species and site (2013 experiment) or species (2014 experiment) on macroinvertebrate colonization of leaf litter of alder and acacia in the coarse mesh bags.

Effect		Abundance	Richness	Biomass
2013	Species	$F_{1,37} = 0.06, p = 0.82$	$F_{1,37} = 0.01, p = 0.92$	---
	Site	$F_{1,37} = 4.76, p < 0.05$	$F_{1,37} = 7.05, p < 0.05$	---
	Interaction	$F_{1,37} = 1.09, p = 0.30$	$F_{1,37} = 0.22, p = 0.64$	---
2014	Species	$F_{1,37} = 0.62, p = 0.44$	$F_{1,37} = 0.26, p = 0.61$	$F_{1,37} = 0.82, p = 0.37$

Figure 2. Abundance and biomass (mean \pm SE) of the macroinvertebrates colonizing alder and acacia leaf litter in the coarse mesh bags of the two sites in the 2013 experiment (left) and in the 2014 experiment (right).

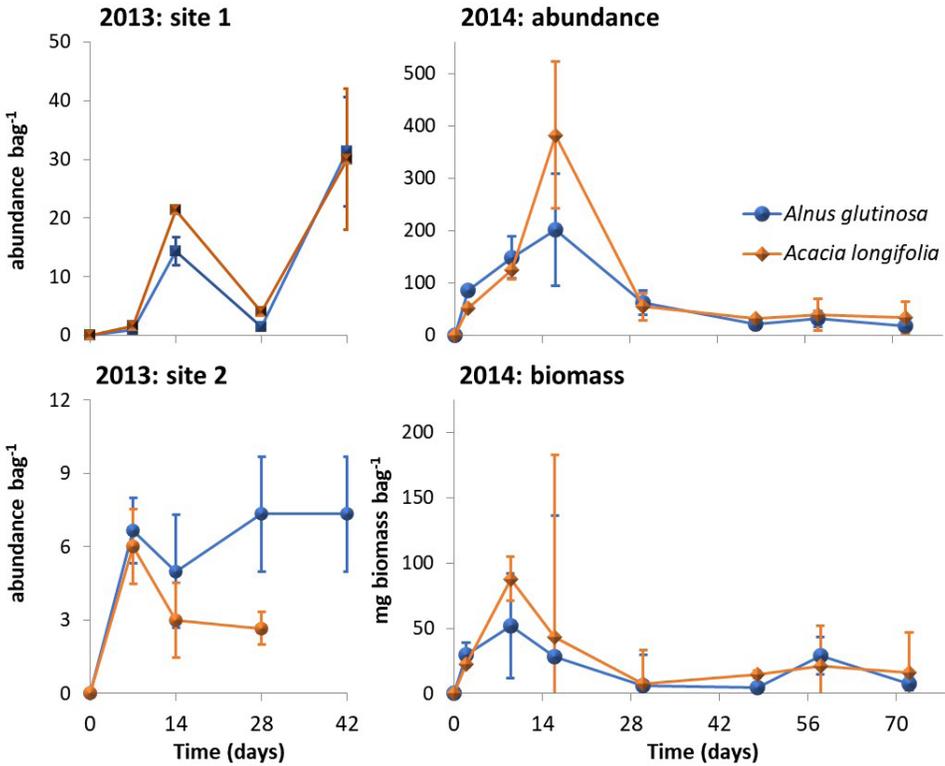
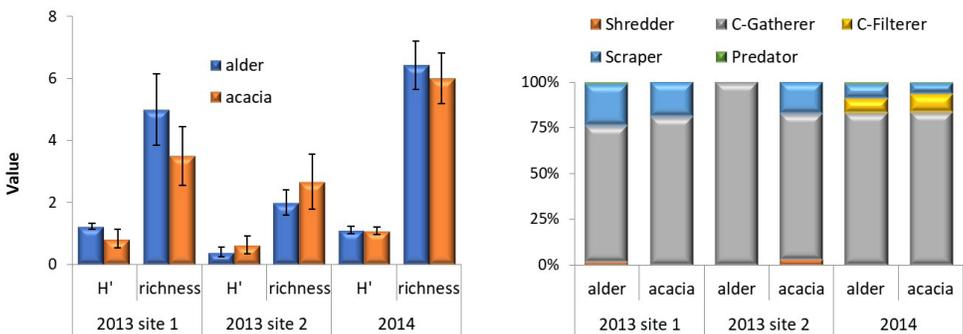


Figure 3. Taxa richness, Shannon-Wiener diversity index (mean \pm SE; left) and proportion of functional feeding groups (C-G=collector-gatherer, C-F=collector-filterer; right) of the macroinvertebrates colonizing alder and acacia leaf litter in the coarse mesh bags of the two sites in the 2013 experiment and in the 2014 experiment.



4 DISCUSSION

Although the ecological status of the stream is compromised (Isidoro, 2014), the aquatic communities were able to process leaf litter from the autochthonous species. Alder leaf litter is rich in nitrogen, soft, and fast-decomposing due to both microbial activity and

feeding preference by leaf-shredding invertebrates (Abelho, 2001). Under regular current velocity conditions, most mass loss of alder was due to microbial-driven decomposition, as shown by the small difference between coarse and fine mesh bags. Other works have shown higher aquatic hyphomycete sporulation rates and species richness in alder when compared to acacia species, resulting in faster decomposition rates (Pereira et al., 2021; Pereira & Ferreira, 2021). In this stream the macroinvertebrate community was dominated by collector-gatherers, among which the family Chironomidae constituted 43-86% of all invertebrates colonizing alder leaves. Although chironomids are not typical shredders, they can use leaf litter of riparian vegetation - especially from alder - as a food source and many chironomids in streams may be able to feed on fast decomposing leaves (Callisto et al., 2007). Thus, the feeding activity of non-typical shredders was probably the cause for the additional mass loss in coarse mesh bags when compared to the fine mesh bags under regular current velocity.

On the other hand, acacia leaf litter is also rich in nitrogen, but the leaves are tough. Although chironomids constituted 43-74% of all macroinvertebrates colonizing acacia leaves there was no mass loss due to leaf-shredding activity, probably due to leaf cuticle and the tough leaves (Callisto et al., 2007). Thus, mass loss of acacia was totally driven by microbial decomposition (Ferreira et al., 2021), but the effect of microbial activity was low probably due to low aquatic hyphomycete sporulation rates and species richness, as shown for other species of acacia (Pereira et al., 2021; Pereira & Ferreira, 2021). The acacia leaves were recalcitrant to decomposition and the highest mass loss occurred due to fragmentation under strong current velocity and high discharge.

In conclusion, in a future scenario of invasion of the riparian area by *Acacia longifolia*, leaf litter may no longer be the major source of carbon, nutrients, and energy for the stream food web, thus endangering the functioning of the ecosystem.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks two former students, Filipe Serra and Denise Couceiro, for the field and laboratory work.

APPENDIX

List of taxa, functional feeding groups (FFG: C-G: collector-gatherer, C-F: collector-filterer, P: predator, Scr: scraper, Shr: shredder), and abundance of the macroinvertebrates colonizing leaf litter of alder and acacia in the coarse mesh bags in the experiments of 2013 and 2014. Contributions $\geq 10\%$ of the total are highlighted in bold.

2013 experiment			Site 1		Site 2	
FFG	Taxa		alder	acacia	alder	acacia
C-G	Oligochaeta	Lumbricidae	0	0	4	0
C-G		Lumbriculidae	(13%) 18	(16%) 21	6	2
C-G		Naididae	5	4	0	0
C-G		Tubificidae	1	0	0	0
Scr	Gastropoda	Hydrobiidae	(21%) 29	(18%) 24	0	6
Scr	Ephemeroptera	Leptophlebiidae	1	0	0	0
Scr	Coleoptera	Dryopidae	1	0	0	0
P		Laccophilinae	1	0	0	0
C-G	Diptera	Chironomidae	(57%) 77	(62%) 81	(86%) 68	(74%) 26
C-G		Stratiomyidae	0	0	1	0
Shr		Tipulidae	2	0	0	1
Total abundance			135	130	79	35

2014 experiment			alder	acacia
FFG	Taxa			
C-G	Oligochaeta	Lumbricidae	2	2
C-G		Lumbriculidae	25	1
C-G		Naididae	(27%) 464	(33%) 712
C-G		Tubificidae	(11%) 195	170
Scr	Gastropoda	Hydrobiidae	50	61
Scr		Lymnaea	1	0
Scr		Physidae	0	1
P	Arachnida	Hydracarina	3	4
Scr	Ephemeroptera	Baetidae	90	69
Shr	Plecoptera	Nemoura	1	0
P	Trichoptera	Hydroptilidae	0	2
C-F		Hydropsychidae	0	1
P	Diptera	Ceratopogonidae	8	1
P		Chaoboridae	0	1
C-G		Chironomidae	(43%) 739	(43%) 928
C-G		Dixidae	2	1
P		Limoniidae	1	0
C-G		Psychodidae	0	1
C-F		Simuliidae	131	(10%) 206
Total abundance			1712	2161

REFERENCES

- Abelho, M. (2001). From litterfall to breakdown in streams: a review. **ScientificWorldJournal**, 1: 656-80. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.103>
- Abelho, M. & Graça, M.A.S. (1996). Effects of eucalyptus afforestation on leaf litter dynamics and macroinvertebrate community structure of streams in Central Portugal. **Hydrobiologia**, 324: 195–204. <https://doi.org/10.1007/BF00016391>
- Abelho, M. & Graça, M.A.S. (1998). Litter in a first-order stream of a temperate deciduous forest (Margarça Forest, central Portugal). **Hydrobiologia**, 386: 147–152. <https://doi.org/10.1023/A:1003532921432>
- Barliza, J.C. & Peláez, J.D.L. (2010). Litterfall and Nutrient Dynamics in *Acacia mangium* (Mimosaceae) Forest Plantations of Antioquia, Colombia. **Acta Biológica Colombiana**, 15(2): 289-308. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2010000200020&lng=en&tlng=
- Callisto, M., Gonçalves Jr., J.F. & Graça, M.A.S. (2007). Leaf litter as a possible food source for chironomids (Diptera) in Brazilian and Portuguese headwater streams. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24(2): 442–448. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000200023>
- Carnevale, N.J. & Lewis, J.P. (2001). Litterfall and organic matter decomposition in a seasonal forest of the eastern Chaco (Argentina). **Revista de Biología Tropical**, 49(1): 203-212. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442001000100019&lng=en&tlng=en
- Couceiro, D. & Abelho, M. (2015). The invasion of stream borders by *Acacia longifolia*: consequences for ecosystem functioning. Oral presentation in **4th Iberian Congress of Ecology**, Coimbra.
- Ferreira, V., Figueiredo, A., Graça, M.A.S., Marchante, E. & Pereira. (2021). Invasion of temperate deciduous broadleaf forests by N-fixing tree species – consequences for stream ecosystems. **Biological Reviews**, 96(3): 877-902. <https://doi.org/10.1111/brv.12682>
- Ferreira, C.S.S., Walsh, R.P.D., Nunes, J.P.C., Steenhuis, T.S., Nunes, M., Pedroso de Lima, J.L.M., Coelho, C.O.A. & Ferreira, A.J.D. (2016). Impact of urban development on streamflow regime of a Portuguese peri-urban Mediterranean catchment. **Journal of Soils and Sediments**, 16: 2580–2593. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1386-5>
- Isidoro, P. (2014). **Using species traits to assess ecological integrity of urban streams**. Master thesis, University of Coimbra. <http://hdl.handle.net/10316/31104>
- Lorenzo, P., González, L. & Reigosa, M.J. (2010). The genus *Acacia* as invader: the characteristic case of *Acacia dealbata* Link in Europe. **Annals of Forest Science**, 67:101. <https://doi.org/10.1051/forest/2009082>
- Marchante, H., Marchante, E. & Freitas, H. (2003). Invasion of the Portuguese dune ecosystems by the exotic species *Acacia longifolia* (Andrews) Willd.: effects at the community level. In L.E. Child, J.H. Brock, G. Brundu, K. Prach, P. Pyšek, P.M. Wade and M. Williamson (Eds.). **Plant Invasion: Ecological Threats and Management Solutions**, pp. 75–85. Backhuys Publishers.
- Marchante, H., Marchante, E., Freitas, H. & Hoffmann, J. H. (2015). Temporal changes in the impacts on plant communities of an invasive alien tree, *Acacia longifolia*. **Plant Ecology**, 216: 1481–1498. <https://doi.org/10.1007/s11258-015-0530-4>
- Merritt, R.W. & Cummins, K.W. (1996). **Introduction to the Aquatic Insects of North America**, 3rd ed. Dubuque, IA: Kendall/Hunt.

Molinero, J. & Pozo, J. (2004). Impact of a eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) plantation on the nutrient content and dynamics of coarse particulate organic matter (CPOM) in a small stream. **Hydrobiologia**, 528: 143–165. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-2338-4>

Pereira, A. & Ferreira, V. (2021). Invasion of Native Riparian Forests by *Acacia* species affects in-stream litter decomposition and associated microbial decomposers. **Microbial Ecology**, 81: 14–25. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01552-3>

Pereira, A. & Ferreira, V. (2022). Increasing inputs of invasive N-fixing *Acacia* litter decrease litter decomposition and associated microbial activity in streams. **Freshwater Biology**, 67(2): 292–308. <https://doi.org/10.1111/fwb.13841>

Pereira, A., Figueiredo, A. & Ferreira, V. (2021). Invasive *Acacia* tree species affect instream litter decomposition through changes in water nitrogen concentration and litter characteristics. **Microbial Ecology**, 82: 257–273. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01749-0>

Pozo, J., González, E., Díez, J. & Elosegi, A. (1997). Leaf-litter budgets in two contrasting forested streams. **Limnetica**, 13(2): 77–84. <https://www.limnetica.com/documentos/limnetica/limnetica-13-2-p-77.pdf>

Railoun, M.Z., Simaika, J.P. & Jacobs, S.M. (2021). Leaf litter production and litter nutrient dynamics of invasive *Acacia mearnsii* and native tree species in riparian forests of the Fynbos biome, South Africa. **Forest Ecology and Management**, 498: 119515. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119515>

Serra, F. & Abelho, M. (2018). Decomposition of the invasive *Acacia longifolia* in a peri-urban stream. In **Book of Abstracts of the XIX Conference of the Iberian Association of Limnology**, p. 68. University of Coimbra, Coimbra.

Souza-Alonso, P., Rodríguez, J., González, L. & Lorenzo, P. (2017). Here to stay. Recent advances and perspectives about *Acacia* invasion in Mediterranean areas. **Annals of Forest Science**, 74: 55. <https://doi.org/10.1007/s13595-017-0651-0>

Sugimoto, M., Ohta, S., Ansori, S. & Arisman, H. (2013). Nutrient dynamics via litterfall and litter decomposition on the forest floor of an *Acacia mangium* Willd. stand in Sumatra. **Tropics**, 22(2): 6781.

Tachet, H., Philippe Richoux, P., Michel Bournaud, M. & Philippe Usseglio-Polatera, P. (2010). **Invertébrés d'eau douce - systématique, biologie**, écologie. CNRS Editions. ISBN: 9782271069450

Zar, J.H. (2010). **Biostatistical analysis** (5th ed.). Prentice-Hall.

CAPÍTULO 11

REMOCIÓN DE CINCO PRODUCTOS FARMACÉUTICOS CATALOGADOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN MEDIO ACUOSO UTILIZANDO LA ESPECIE VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)

Data de submissão: 30/03/2023

Data de aceite: 18/04/2023

Miriam Checa-Artos

Escuela Superior Politécnica del Litoral
Facultad de Ciencias de la Vida
Centro de Investigaciones
Biotecnológicas del Ecuador
Guayaquil, Ecuador
Universidad de las
Fuerzas Armadas ESPE
Sangolquí, Ecuador

<https://orcid.org/0000-0002-9606-7896>

Daynet Sosa del Castillo

Escuela Superior Politécnica del Litoral
Facultad de Ciencias de la Vida
Centro de Investigaciones
Biotecnológicas del Ecuador
Guayaquil, Ecuador

<https://orcid.org/0000-0001-5403-9072>

Eulalia Vanegas María

Centro de Estudios Ambientales
Departamento de Química Aplicada y
Sistemas de Producción
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Cuenca
Cuenca, Ecuador

Omar Ruiz-Barzola

Escuela Superior Politécnica del Litoral
Facultad de Ciencias de la Vida
Centro de Investigaciones
Biotecnológicas del Ecuador
Guayaquil, Ecuador
Departamento de Estadística
Universidad de Salamanca, USal
Salamanca, España

<https://orcid.org/0000-0001-8206-1744>

Milton Barcos-Arias

Escuela Superior Politécnica del Litoral
Facultad de Ciencias de la Vida
Centro de Investigaciones
Biotecnológicas del Ecuador
Guayaquil, Ecuador

<https://orcid.org/0000-0003-0863-6778>

RESUMEN: Los productos farmacéuticos constituyen un grupo único de contaminantes emergentes de gran interés, debido a que se ha determinado su presencia frecuente en aguas superficiales, subterráneas y agua potable. Debido al metabolismo y la absorción incompletos en el organismo humano, una cantidad significativa de estos fármacos se excretan y liberan al ambiente a través de las aguas residuales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) para eliminar del medio acuoso cinco productos farmacéuticos comúnmente recetados y de

venta libre como ciprofloxacina, ibuprofeno, sulfametaxazol, diclofenaco y acetaminofén. La especie fue aclimatada en invernadero, donde se llevó a cabo los experimentos en condiciones controladas de temperatura y a un pH de 6,5. Las muestras fueron analizadas utilizando espectrofotometría UV-Vis para leer en forma directa las absorbancias de cada producto farmacéutico. Para el análisis estadístico de los datos se empleó la metodología de superficies de respuesta con el fin de encontrar los modelos que ayuden a determinar tiempos y concentraciones óptimas donde se maximiza la absorción de cada fármaco, así como la obtención de las pendientes de crecimiento para determinar hacia donde se deberá buscar el óptimo. Se utilizó el software estadístico R versión 3.6.0 y RStudio versión 1.1.453. Los resultados obtenidos indican que *C. zizanioides* removió de manera más eficiente ciprofloxacina (98,3%) a una concentración de 3mg/L en un tiempo de 149h, seguido por ibuprofeno y diclofenaco con un máximo de remoción de 73,33% y sulfametaxazol con 66,53%, obteniéndose el menor porcentaje de remoción para acetaminofén de 38,49% a las 192h, donde se realizó toma de muestras cada 48 horas de las soluciones de cada fármaco a diferentes concentraciones (3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L). En este trabajo de investigación se demostró la capacidad removedora de *Chrysopogon zizanioides* de los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en condiciones controladas, vislumbrando un gran potencial en el ámbito de la biotecnología ambiental para el tratamiento terciario de aguas residuales.

PALABRAS CLAVE: Productos farmacéuticos. Contaminantes emergentes. Aguas residuales. Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*). Fitorremediación. Superficie de respuesta.

REMOVAL OF FIVE PHARMACEUTICAL PRODUCTS CLASSIFIED AS EMERGING POLLUTANTS IN AQUEOUS MEDIUM USING THE VETIVER SPECIES (*Chrysopogon zizanioides*)

ABSTRACT: Pharmaceutical products constitute a unique group of emerging pollutants of great interest because their frequent presence in surface waters, groundwater, and drinking water have been determined. Due to incomplete metabolism and absorption in the human body, many of these drugs are excreted and released to the environment through wastewater. Therefore, this work's objective was to evaluate the potential of the vetiver species (*Chrysopogon zizanioides*) to eliminate five commonly prescribed and over-the-counter pharmaceuticals from the aquatic environment, such as ciprofloxacin, ibuprofen, sulfamethoxazole, diclofenac, and acetaminophen. The species was acclimated in wintering to carry out the experiments under standard temperature conditions and a pH of 6.5. The samples were analyzed using UV-Vis spectrophotometry to read the absorbances of each pharmaceutical product directly. For the statistical analysis of the data, the response surfaces methodology was used to find the models that help determine optimal times and concentrations where the absorption of each drug is maximized and obtain the growth slopes to determine where the optimum should be sought. Statistical software R version 3.6.0 and RStudio version 1.1.453 were used. The results obtained indicate that *C. zizanioides* more efficiently removed ciprofloxacin (98.3%) at a concentration of 3mg/L over a time of 149h, followed by ibuprofen and diclofenac with a maximum removal of 73.33% and sulfametaxazole with 66.53%, obtaining the lowest percentage of removal for acetaminophen of 38.49% at 192h, where samples were taken every 48 hours of the

solutions of each drug at different concentrations (3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L). In this research work, the removal capacity of *Chrysopogon zizanioides* of the five drugs studied in an aqueous medium under controlled conditions was demonstrated, envisaging great potential in the field of environmental biotechnology for tertiary wastewater treatment.

KEYWORDS: Pharmaceuticals products. Emerging pollutants. Wastewater. Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*). Phytoremediation. Response surface.

1 INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos que actualmente no están incluidos en las regulaciones de calidad del agua, sin embargo, presentan amenazas potenciales para los ecosistemas acuáticos, la salud y la seguridad humana. Abarcan un grupo diversos de compuestos que incluyen a productos farmacéuticos (PFs), drogas de abuso, productos de cuidado personal (PCP), esteroides y hormonas, tensioactivos, compuestos per fluorados (PFC), llama retardantes, aditivos industriales y agentes aditivos de gasolina, así como sus productos de transformación, nanomateriales, 1,4-dioxano y subproductos de desinfección de piscinas (DBP)^{1,2,3}.

Los PFs se caracterizan por el uso extenso en medicina humana y veterinaria y están conformados por diversos grupos de compuestos como antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, antidepresivos, drogas de abuso, antidiabéticos, suplementos alimenticios, entre otros. La gran mayoría se excreta sin metabolizar después de su aplicación, llegando así a las aguas residuales^{4,5}.

La presencia de PFs en el ciclo del agua se ha reportado en todo el mundo. Su detección ha suscitado preocupación, ya que se ha determinado su presencia en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, en aguas superficiales (ríos, manantiales, lagunas, lagos y mares), aguas subterráneas e incluso en sistemas de tratamiento de agua potable^{6,7,8,9,10,11,12,13}.

Una investigación llevada a cabo por el Servicio Geológico de los Estados Unidos en 2002 fue el primer estudio de reconocimiento para demostrar la gran cantidad de PFs, hormonas esteroides y otros^{3,14}.

La aparición y el destino de los PFs y sus metabolitos en el medio acuático han sido reconocidos como un problema emergente, debido a que se sabe poco con respecto a los posibles efectos de estos compuestos en organismos vivos, principalmente la toxicidad crónica y posibles efectos aditivos de una amplia gama de PFs presentes en el ambiente acuático, inclusive a muy bajas concentraciones (ng/L y µg/L)^{15,16}.

Los PFs más prescritos en medicina humana son los analgésicos antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamazepina,

antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los bloqueantes como el metoprolol, además de los fármacos cada vez más utilizados en veterinaria, acuicultura, ganadería y avicultura¹⁷.

Los ingredientes farmacéuticos activos se detectan cada vez más en el medio ambiente debido a varios factores, incluidos los avances en las prácticas médicas humanas y veterinarias, y la mejora de la sensibilidad de la instrumentación analítica.

La presencia de PFs en el agua podría fomentar la diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos, que pueden interactuar con la flora intestinal, lo que podría afectar la salud humana¹⁸. Los antibióticos constituyen un importante contaminante del agua y pueden alterar o influir selectivamente en la función de otros organismos en concentraciones bajas.

Por otro lado, la irrigación con agua que contiene PFs podría implicar que los cultivos puedan absorber estos compuestos, siendo otra ruta de exposición humana¹⁹.

Un proyecto realizado por la Agencia Federal Alemana del Medio Ambiente (UBA), recopila datos publicados en el ámbito mundial sobre concentraciones medidas de PF. Los resultados ilustran que las concentraciones acuáticas detectadas a escala global son comparables con las encontradas en Europa. Se ha demostrado que más de 600 sustancias farmacéuticas están presentes en el medio ambiente en todo el mundo²⁰.

China tiene la mayor población y cantidad de fabricantes farmacéuticos del mundo. En 2011, produjo más de 1500 tipos de PFs. Los ingredientes activos locales se produjeron en China, y el estimado y la producción nacional fue de aproximadamente 2,000,000 toneladas²¹.

Existen estudios alrededor del planeta, que han detectado la presencia de contaminantes emergentes a la entrada y salida de las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales, lo que presupone que no están diseñadas para el tratamiento de este tipo de contaminantes. En un estudio realizado en Algeria, se reportó la presencia de ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en aguas superficiales; ibuprofeno y ketofreno en agua de grifo, confirmando la incapacidad de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) clásica para eliminar estos contaminantes²².

Otro estudio realizado en la India muestra que tanto aguas superficiales como subterráneas están contaminadas con más de 15 contaminantes emergentes (Fármacos, productos de aseo personal y edulcorantes artificiales), poniendo en riesgo la salud de 600 millones de personas que habitan en la cuenca del río Ganges²³.

Según²⁴, las características de la calidad del agua y los contaminantes orgánicos emergentes fueron muestreados en Ecuador, a lo largo de los ríos San Pedro – Guayllabamba – Esmeraldas y sus principales afluentes en el verano de 2013. Los

principales compuestos detectados fueron venlafaxina, carbamazepina, sulfametoxazol y benzoilcgonina. El estudio permitió relacionar el consumo de fármacos en una de las principales ciudades (Quito) de América Latina y permitió mostrar que el consumo de la mayoría de las drogas muestreadas (carbamazepina, venlafaxina, O-des metil venlafaxina, sulfametoxazol, etinilestradiol) estuvo por debajo de su nivel de consumo promedio en Europa, Israel y América del Norte²⁴.

En varias investigaciones realizadas en todo el mundo, los fármacos de estudio acetaminofén, ibuprofeno, diclofenaco, sulfametaxazol y ciprofloxacina han sido detectados en aguas superficiales^{3,6,7,25,26}; en aguas subterráneas^{8,23,27,28,29}; en aguas residuales^{9,10,11,12,30,31,32,33,34,35,36}, en agua potable^{13,37,38}.

Los desafíos más críticos de las cuencas urbanas son suministrar agua dulce de buena calidad a las ciudades y eliminar las aguas residuales sin poner en peligro los recursos hídricos y el medio ambiente, dado que la exposición a contaminantes de preocupación emergente incluye el desarrollo de resistencia a antibióticos, alteración endócrina y la carcinogenicidad. Por lo tanto, comprender la ocurrencia y distribución de contaminantes orgánicos complejos ayuda a predecir y mitigar sus posibles efectos sobre la salud ecológica y humana en los ambientes acuáticos³⁹.

Por lo expuesto, es necesario investigar tratamientos alternativos sostenibles, de bajo costo y de alto porcentaje de remoción de estos contaminantes emergentes, que pudieran constituir un tratamiento terciario de aguas residuales, tal es el caso de la fitorremediación.

El interés en la fitorremediación como método para resolver la contaminación ambiental ha estado creciendo rápidamente en los últimos años. Esta tecnología verde que involucra “plantas tolerantes” se ha utilizado para limpiar el suelo y el agua subterránea de metales pesados y otros compuestos orgánicos tóxicos. La fitorremediación implica el cultivo de plantas en una matriz contaminada para eliminar contaminantes ambientales, facilitando el secuestro y / o degradación (desintoxicación) de los contaminantes⁴⁰.

La fitorremediación proporciona una alternativa segura y económica en comparación con los métodos de tratamiento físico y químico y se ha aceptado como una de las mejores prácticas de gestión para varios servicios de gestión ambiental⁴¹.

La fitorremediación utiliza mecanismos de las plantas para remediar ambientes contaminados, como la fito-extracción, rizo-filtración, fito-estabilización, fito-degradación y fito-volatización. Estos procesos contribuyen a la remediación, desintoxicación, lixiviación, contención y estabilización de contaminantes^{40,42}.

La selección de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) para la presente investigación, se basó en el alto número de reportes científicos que denotan la efectividad

que tiene esta especie removiendo diferentes tipos de contaminantes como metales pesados y algunos contaminantes orgánicos, indicando que estas técnicas son rentables en comparación con otros métodos^{40,43,44}.

Las principales ventajas de *Chrysopogon zizanioides* están relacionadas con su sistema radicular fibroso masivo y la rápida tasa de producción de biomasa de hasta 354 kg/Ha en seis meses, lo que la convierte en una especie versátil para diferentes usos como, estabilización de taludes, rehabilitación de ambientes contaminados, tratamiento de aguas residuales, tratamiento de drenaje ácido de minas, fitoextracción de metales y de algunos compuestos orgánicos^{41,45,46,47}.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo principal contribuir con una técnica probada en laboratorio para la remoción de los contaminantes emergentes acetaminofén, ciprofloxacina, diclofenaco, sulfametoxazol e ibuprofeno por medio de fitorremediación, utilizando la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), lo que podría servir de base en el mediano plazo para el desarrollo de sistemas de tratamiento terciario de aguas residuales que eliminen estos contaminantes en el medio acuático.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA ESPECIE VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)

Las plántulas de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), fueron recolectadas y sembradas en un vivero ubicado en la ciudad de Milagro, provincia del Guayas por un tiempo aproximado de dos meses, y luego se trasladaron al invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), en donde se las dispuso en terrenos aledaños al invernadero durante aproximadamente 30 días. Posteriormente se realizó un lavado a fondo para eliminar todo el suelo e impurezas de la zona radicular y se procedió a transferir las plantas a canastillas rectangulares de 25 litros de capacidad para ser aclimatadas en agua durante 20 días, previo a su uso en los experimentos de fitorremediación de los productos farmacéuticos en estudio. Este es un proceso adaptado en base a lo establecido por⁴⁸.

2.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

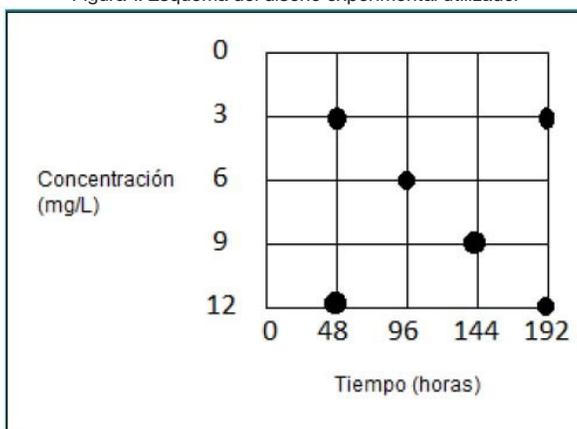
Se estudiaron cinco PFs de manera independiente: sulfametoxazol, ciprofloxacina, acetaminofén, ibuprofeno y diclofenaco todos de la marca SIGMA-ALDRICH de 99,9 % de pureza. De cada fármaco se prepararon soluciones acuosas utilizando metanol ultrapuro de la marca Merck a cuatro concentraciones: 3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L. Se

utilizaron 4 tiempos de muestreo 48 h, 96 h, 144 h y 192 h, para obtener la variable de respuesta que es el porcentaje de remoción.

Se colocaron dos unidades experimentales de dos litros de solución de cada PFs y por cada concentración seleccionados para esta investigación, luego se introdujo la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) con un peso aproximado de 60 g. Los ensayos fueron mantenidos a una temperatura de 25°C y un pH de 6,5 durante todo el experimento. Una vez concluido el tiempo del ensayo se procedió a recolectar con una micropipeta tres alícuotas de 2 ml de cada unidad experimental. El volumen recolectado fue colocado en tubos eppendorf y almacenados a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.

Se utilizó el diseño factorial, con dos puntos internos; Concentración (C) y Tiempo (T), siendo estos los factores; los niveles considerados se indican en la figura 1.

Figura 1. Esquema del diseño experimental utilizado.



Para medir la variable de respuesta, porcentaje de remoción del PF, previamente se midió por triplicado la absorbancia de cada uno de los PFs utilizando la técnica de espectrofotometría de luz Uv visible.

Para determinar el porcentaje de remoción de los compuestos en estudio se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de remoción (\%)} = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} \times 100$$

2.3 ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico de los datos se empleó la técnica de superficies de respuesta para encontrar los modelos que ayuden a determinar tiempos y concentraciones óptimas donde se maximiza la absorción de cada fármaco, así como la obtención de las

pendientes de crecimiento para determinar hacia donde se deberá buscar el óptimo, en los casos donde no se los encontró. Se utilizó el software estadístico R versión 3.6.0 y RStudio versión 11.453.

3 RESULTADOS

3.1 MODELO GENERAL

El modelo general de la superficie de respuesta está representado por la ecuación (1):

$$Y = b_0 + b_1C + b_2T + b_3C^2 + b_4T^2 + b_6C * T \quad (1)$$

Donde,

Y= porcentaje de remoción

b_0 = intercepto

b_i = coeficientes del modelo

C = Concentración

T = Tiempo

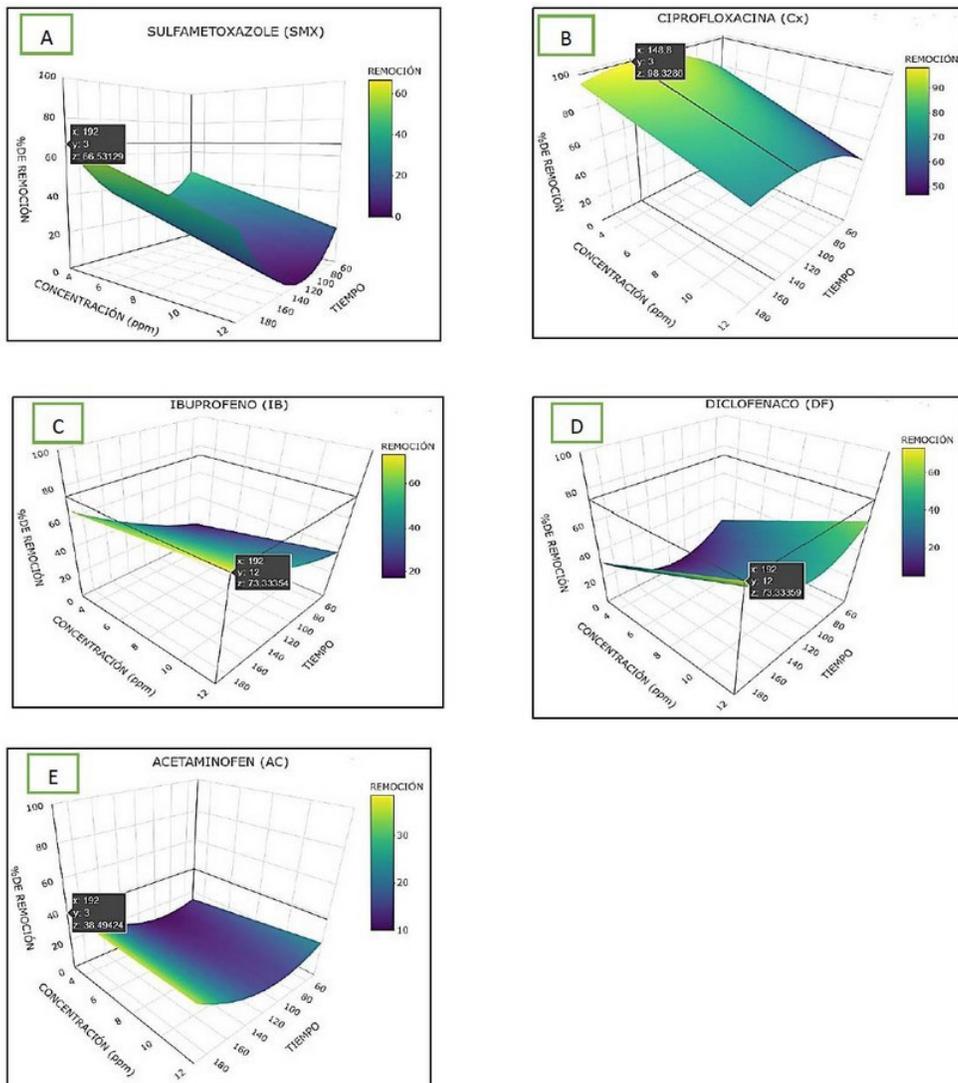
La matriz resultante no permitió obtener un modelo polinómico de grado 2 para ambos factores a la vez, por lo que se desarrolló un modelo con forma cuadrática para un factor, mientras se mantuvo la linealidad en el otro factor según las ecuaciones (2), (3).

Tabla 1.- Modelo general de superficie de respuesta para cada uno de los fármacos de estudio.

C^2	T^2
$Y = b_0 + b_1C + b_2T + b_3C^2 + b_4T * C \quad (2)$	$Y = b_0 + b_1C + b_2T + b_3T^2 + b_4C * T \quad (3)$

	C^2	T^2
SULFAMETOXAZOLE (SMX)	$Y = 97.34 - 23.24 C + 0.15 T + 1.36 C^2 - 0.0026 C * T$	$Y = 97.34 - 2.8704C - 1.1264 T - 0.0053T^2 - 0.0025C * T$
CIPROFLOXACINA (Cx)	$Y = 66.54 + 4.21 C + 0.078 T - 0.54 C^2 + 0.0069 C * T$	$Y = 66.54 + 3.95 C - 0.5885 T - 0.0021 T^2 - 0.0069 C * T$
ACETAMINOFEN (AC)	$Y = 26.79 - 8.89 C + 0.193 T + 0.684 C^2 - 0.0087 C * T$	$Y = 26.79 + 1.38 C - 0.4480 T + 0.0027 T^2 - 0.0087 C * T$
IBUPROFENO (IB)	$Y = 1.70 - 0.88 C + 0.35 T + 0.22 C^2 - 0.008 C * T$	$Y = 1.71 + 2.46 C + 0.15 T + 0.00087 T^2 - 0.008 C * T$
DICLOFENACO (DF)	$Y = 46.34 - 12.41 C + 0.058 T + 1.10 C^2 + 0.003 C * T$	$Y = 46,34 + 4.10 C - 0.97 T + 0.0043 T^2 + 0,003 C * T$

Figura 2.- Resultados obtenidos con la técnica superficie de respuesta para la remoción con *Chrysopogon zizanioides* de los fármacos A) sulfametoxazol, B) ciprofloxacina, C) ibuprofeno, D) diclofenaco y E) acetaminofén en medio acuoso a concentraciones de 3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L y 12 mg/L, durante cuatro tiempos de muestreo 48 h, 96 h, 144 h y 192 h.



En el modelo obtenido para sulfametaxazol (Figura 2A), los coeficientes de la variable C, T y T², fueron significativos por lo que se pudo reducir el modelo para obtener más información eliminando el término no significativo, el cual resulta de la interacción entre las variables de concentración y tiempo, según la ecuación (4).

$$\% \text{ de remoción} = 97.34 - 2.8704 C - 1.1264 T + 0.0053 T^2 - 0.0025 C * T \quad (4)$$

En el rango estudiado, para el fármaco sulfametoxazol, inicia con un porcentaje de remoción de 46,52%, a una concentración de 3mg/L en un tiempo de 48h, dicho porcentaje presenta un descenso en las primeras 105h; a partir de ese tiempo se observa que el porcentaje de remoción tiene un ascenso más pronunciado, alcanzando un máximo de remoción de 66.53%, a la concentración de 3mg/L en un tiempo de 192h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, se visualiza que para encontrar el óptimo sería necesario reducir las concentraciones e incrementar el tiempo, se puede considerar también la posibilidad de encontrar el óptimo en la reducción de tiempo y de concentración.

Para la ciprofloxacina (Figura 2B), el modelo responde de manera similar al modelo del sulfametaxazol, donde tenemos la ecuación (5):

$$\% \text{ de remoción} = 66.54 - 3.95 C + 0.5885 T - 0.0021 T^2 + 0.0069 C * T \quad (5)$$

En el rango estudiado, para la ciprofloxacina se observa que el porcentaje de remoción parte con un 79.05%, en una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48h, este porcentaje logra alcanzar un máximo de remoción de 98.32% a las 149h, al alcanzar este máximo, se produce el proceso inverso y el porcentaje de remoción comienza a reducirse, se observa que para alcanzar el óptimo es necesario reducir las concentraciones manteniendo el tiempo de 149h.

En el modelo estudiado para el ibuprofeno (Figura 2C), los valores de las variables C, T, T² y C*T, son significativos por lo que se presenta un modelo que obtiene la mayor información, acorde a la ecuación (6).

$$\% \text{ de remoción} = 1.71 + 2.46 C + 0.15 T + 0.00087 T^2 - 0.008 C * T \quad (6)$$

El ibuprofeno inicia con un porcentaje de remoción de 17.00%, a una concentración de 3mg/L en un tiempo de 48h, dicho porcentaje presenta un ascenso pronunciado alcanzando un máximo de remoción de 73.33%, a una concentración de 12mg/L en un tiempo de 192h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, se observa que para encontrar el óptimo es necesario aumentar las concentraciones e incrementar el tiempo.

En el modelo estudiado para el diclofenaco (Figura 2D), los valores de la variable C, T y T² son significativos por lo que se puede reducir el modelo para obtener más información eliminando el término que no es significativo, el cual resulta de la interacción entre las variables de concentración y tiempo, como se observa en la ecuación (7).

$$\% \text{ de remoción} = 46,34 + 4.10 C - 0.97 T + 0.0043 T^2 + 0,003 C * T \quad (7)$$

En el caso del diclofenaco inicia con un porcentaje de remoción de 28.18%, con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48h, dicho porcentaje presenta un descenso en las primeras 106h; a partir de ese tiempo se observa que el porcentaje de remoción tiene un ascenso alcanzando un máximo de remoción de 73.33%, con una concentración de 12mg/L en un tiempo de 192h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, vemos que para encontrar el óptimo sería necesario aumentar las concentraciones e incrementar el tiempo.

En el modelo estudiado para el acetaminofén (Figura 2E), se comporta de manera similar a lo presentado en los otros fármacos, tal como lo muestra la ecuación (8).

$$\% \text{ de remoción} = 26.79 + 1.38 C - 0.4480 T + 0.0027 T^2 - 0.0087 C * T \quad (8)$$

El acetaminofén inicia con un porcentaje de remoción de 14.33%, a una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48h, dicho porcentaje presenta un descenso lento en las primeras 91h; a partir de ese tiempo se observa que el porcentaje de remoción tiene un ascenso alcanzando un máximo de remoción de 38.49%, con una concentración de 3mg/L en un tiempo de 192h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, vemos que para encontrar el óptimo es necesario reducir las concentraciones e incrementar el tiempo. También se podría considerar la posibilidad de encontrar el óptimo reduciendo el tiempo y la concentración.

4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron la capacidad de *Chrysopogon zizanioides* para remover los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en un periodo experimental de 192 h a diferentes concentraciones consideradas en esta investigación (3, 6, 9 y 12 mg/L).

Los valores obtenidos para el sulfametoxazol alcanzaron un porcentaje máximo de 66.53% a las 192 h (Figura 2A), valor de remoción que resulta no óptimo.

Al analizar el ascenso de la curva de absorción, se visualiza que para encontrar el óptimo sería necesario reducir las concentraciones e incrementar el tiempo. Sin embargo, los valores de absorción del sulfametoxazol resultan semejantes a los reportados en otros estudios. Se ha registrado un porcentaje de remoción de alrededor del 19.0% únicamente después de 24 h de exposición en plantas de col china y espinaca de agua con soluciones de sulfametoxazol a una concentración de 100 mg/L⁴⁹.

Al analizar las muestras correspondientes a la ciprofloxacina se obtuvieron valores óptimos del 98.32% a las 149 h (Figura 2B) con una concentración de 3 mg/L,

estos resultados son similares a un estudio donde se alcanzó una remoción del 97.0% de ciprofloxacina en un período experimental de 30 días, en plantas expuestas a 0,05 y 0,1 mg/L de este antibiótico, y 80.0% y 85.0% de remoción respectivamente al ser expuestas a soluciones con concentraciones de 1 a 10 mg/L de ciprofloxacina⁴¹.

Los ensayos realizados con ibuprofeno para evidenciar la capacidad de *Chrysopogon zizanioides* como agente de fitoremediación de este fármaco, arrojaron resultados favorables con un porcentaje de remoción máximo de 73.33% a las 192 h (Figura 2C). En otro estudio, se demostró que el ibuprofeno puede ser removido de un medio acuoso en su totalidad por la especie *Phragmites australis* después de 21 días de exposición a una concentración de 60 mg/L⁵⁰. Bajo estos parámetros es posible que *Chrysopogon zizanioides* tenga la misma capacidad de remoción con respecto al ibuprofeno por lo que se sugieren ensayos a futuro que consideren tiempos prolongados de exposición de esta especie vegetal en medio acuoso con este fármaco.

En este estudio se logró un porcentaje máximo de remoción del 73.33% del diclofenaco a las 192 h (Figura 2D), los valores máximos obtenidos en este estudio resultan semejantes a otros reportes donde se usaron especies vegetales para determinar sus capacidades de absorción del diclofenaco, como es el caso de la especie *Typha latifolia* que fue el objeto de estudio de⁵¹, quienes demostraron que dicha especie es capaz de absorber un máximo del 80.0% del diclofenaco presente en una concentración de 1mg/L.

Por otra parte, el acetaminofén arrojó valores máximos de 38.49% a las 192 h (Figura 2E) a una concentración de 3mg/L, siendo este valor de remoción el menor registrado entre los cinco fármacos analizados en este trabajo de investigación. Varias pueden ser las razones de la baja remoción, incluyendo las características del fármaco y su compatibilidad con la estructura de la especie vegetal evaluada. En un estudio usando *Brassica juncea*, el porcentaje de remoción para el acetaminofén alcanzó el 60.0% en 165 h a una concentración de 1 mM que corresponde aproximadamente a 150mg/L^{52 52}.

Asimismo, se ha reportado en varios informes que *Chrysopogon zizanioides* tiene la capacidad de remover fenol, tetraciclina y 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) del sustrato en el que crece⁴⁷. *Chrysopogon zizanioides* puede considerarse como uno de los mejores fitorremediadores de la acrilamida por ser una planta perenne con gran biomasa y un sistema radicular largo, denso y extendido, por lo que esta planta es capaz de absorber acrilamida en el suelo durante un largo período de tiempo⁴⁰.

En comparación con otras plantas, *Chrysopogon zizanioides* es más eficiente en la absorción de ciertos metales pesados y productos químicos debido a la capacidad de su sistema de raíces para alcanzar mayores profundidades y volumen. Asimismo, se descubrió que esta planta es altamente tolerante en condiciones extremadamente

adversas, por lo tanto, se puede utilizar para la rehabilitación de relaves mineros, vertederos de basura y vertederos de desechos industriales que a menudo son extremadamente ácidos o alcalinos, ricos en metales pesados y bajos en nutrientes para las plantas⁴³. Adicionalmente, sostienen que las plantas pueden limpiar muchos tipos de contaminantes como metales, pesticidas, aceites y explosivos¹⁷.

Es importante señalar que *Chrysopogon zizanioides* se mantuvo fresca y saludable durante las 192 h que duró el experimento, en todas las soluciones preparadas a las cuatro concentraciones consideradas en este estudio, lo que demuestra que es una especie resistente y apropiada para la fitorremediación de estos contaminantes emergentes, esto es consistente con otros reportes que indican esta especie fue bastante resistente, inclusive a la radiación en comparación con otras plantas⁵³. En otro estudio se demostró un crecimiento normal y aparentemente saludable de *Chrysopogon zizanioides* por un periodo de 12 meses en un suelo contaminado por una mina de hierro⁵⁴.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan la eficiencia del vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) en la remoción de los cinco fármacos del estudio, lo que demuestra que la técnica de fitorremediación funciona eficientemente bajo condiciones controlada (invernadero) y pudiera ser prometedora a mayor escala, lo cual fue probado en 1995 en Queensland, Australia, donde este pasto, fue reconocido por primera vez por tener características «súper absorbentes» adecuadas para la eliminación de lixiviados y efluentes generados en vertederos y plantas de tratamiento de aguas residuales, lo mismo fue corroborado por científicos chinos en 1997 y desde entonces el denominado Sistema Vetiver se ha utilizado con éxito para estos fines en Australia, China y Tailandia^{44,47}. Vetiver atrajo la atención mundial como un medio natural para diversas aplicaciones ambientales, incluyendo la desintoxicación de suelos y agua contaminados⁴⁶.

5 CONCLUSIONES

En este estudio la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) removió porcentajes considerables de los cinco fármacos estudiados sulfametoxazol, ciprofloxacina, acetaminofén, ibuprofeno y diclofenaco en medio acuoso.

Se ha podido determinar que (*Chrysopogon zizanioides*) removió de forma eficiente en todas las soluciones a las cuatro concentraciones preestablecidas de ciprofloxacina e ibuprofeno, alcanzando una remoción máxima de 98.00% y 73.00%, respectivamente a una concentración de 3mg/L.

Con sulfametoxazol en las primeras 48 horas se alcanzó una remoción de aproximadamente 50.00% y de más del 70.00% al finalizar el experimento, en concentraciones bajas de alrededor de 3mg/L.

Los resultados para la remoción del diclofenaco en las condiciones establecidas fueron muy interesantes, pues se alcanzó una remoción de 73.00% aproximadamente a altas concentraciones (12mg/L) en los tiempos finales del experimento.

En el caso del acetaminofén, la remoción por parte del vetiver se presentó relativamente baja en todas las concentraciones establecidas en el estudio. Sin embargo, no deja de ser importante la remoción producida de 38.49% a concentraciones de 3mg/L.

La metodología superficie de respuesta permitió establecer los máximos porcentajes de remoción de los cinco fármacos en las condiciones establecidas para el estudio. Asimismo, ha permitido observar la proyección de la investigación en dirección a obtener los tiempos y concentraciones óptimos, de tal forma que en próximos estudios se podría aumentar o reducir las concentraciones y variar el tiempo.

En este trabajo de investigación se demostró la alta capacidad removedora de *Chrysopogon zizanioides* de los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en condiciones controladas, vislumbrando un gran potencial en el ámbito de la biotecnología ambiental para el tratamiento terciario de aguas residuales con miras a eliminar los productos farmacéuticos en mención.

6 AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por haber facilitado las instalaciones del invernadero y sus laboratorios para el desarrollo de los experimentos. Así mismo, se le agradece el financiamiento proveniente de la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) a través del proyecto DUIC_XIV_2016_037.

REFERENCIAS

1. Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L. & Barceló, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **27**, 991-1007 (2008).
2. Hossain, A. *et al.* Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals in river surface water of Bangladesh. *Environ. Res.* **165**, 258-266 (2018).
3. Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M. & Harrad, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* **3**, 1-16 (2017).
4. Peña-Guzmán, C. *et al.* Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *J. Environ. Manage.* **237**, 408-423 (2019).
5. Gogoi, A. *et al.* Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundw. Sustain. Dev.* **6**, 169-180 (2018).
6. Fang, W., Peng, Y., Muir, D., Lin, J. & Zhang, X. A critical review of synthetic chemicals in surface waters of the US, the EU and China. *Environ. Int.* **131**, 104994 (2019).

7. Paiga, P. *et al.* Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci. Total Environ.* **573**, 164–177 (2016).
8. Kibuye, F. A. *et al.* Fate of pharmaceuticals in a spray-irrigation system: From wastewater to groundwater. *Sci. Total Environ.* **654**, 197–208 (2019).
9. Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R. & Van der Bruggen, B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Sci. Total Environ.* **654**, 324–337 (2019).
10. Gamarra, J. S., Godoi, A. F. L., de Vasconcelos, E. C., de Souza, K. M. T. & Ribas de Oliveira, C. M. Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective. *Chemosphere* **120**, 462–469 (2015).
11. Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K. S. & Subedi, B. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **137**, 113–120 (2017).
12. Alidina, M. *et al.* The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia. *Sci. Total Environ.* **478**, 152–162 (2014).
13. Batt, A. L., Furlong, E. T., Mash, H. E., Glassmeyer, S. T. & Kolpin, D. W. The importance of quality control in validating concentrations of contaminants of emerging concern in source and treated drinking water samples. *Sci. Total Environ.* **579**, 1618–1628 (2017).
14. Zhang, S., Gitungo, S., Axe, L., Dyksen, J. E. & Raczko, R. F. A pilot plant study using conventional and advanced water treatment processes: Evaluating removal efficiency of indicator compounds representative of pharmaceuticals and personal care products. *Water Res.* **105**, 85–96 (2016).
15. Rigobello, E. S., Dantas, A. D. B., Di Bernardo, L. & Vieira, E. M. Removal of diclofenac by conventional drinking water treatment processes and granular activated carbon filtration. *Chemosphere* **92**, 184–191 (2013).
16. Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Occurrence and environmental impact of pharmaceutical residues from conventional and natural wastewater treatment plants in Gran Canaria (Spain). *Sci. Total Environ.* **599–600**, (2017).
17. Shikha, S. & Gauba, P. Phytoremediation of Industrial and Pharmaceutical Pollutants. *Recent Adv. Biol. Med.* **02**, 113 (2016).
18. Szekeres, E. *et al.* Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environ. Pollut.* **236**, 734–744 (2018).
19. Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G. & Pedersen, J. A. Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. *Environmental Science and Technology* **50**, (2016).
20. Küster, A. & Adler, N. Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, (2014).
21. Liu, J. L. & Wong, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* **59**, 208–224 (2013).
22. Kermia, A. E. B., Fouial-Djebbar, D. & Trari, M. Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers. *Comptes Rendus Chim.* **19**, 963–970 (2016).

23. Sharma, B. M. *et al.* Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. *Sci. Total Environ.* **646**, 1459–1467 (2019).
24. Voloshenko-Rossin, A. *et al.* Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers. *Environ. Sci. Process. Impacts* **17**, 41–53 (2015).
25. Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W. & Rand, G. M. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218.* **218**, (2012).
26. Lai, W. W. P., Lin, Y. C., Tung, H. H., Lo, S. L. & Lin, A. Y. C. Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen. *Emerg. Contam.* **2**, 135–144 (2016).
27. Sui, Q. *et al.* Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerg. Contam.* **1**, 14–24 (2015).
28. Jiang, Y. *et al.* Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in Qingcaosha reservoir. *Water (Switzerland)* **10**, (2018).
29. Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J. & Cai, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere* **89**, 1307–1315 (2012).
30. Shraim, A. *et al.* Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arab. J. Chem.* **10**, S719–S729 (2017).
31. Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M. & Smyth, S. A. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* **473–474**, 235–243 (2014).
32. Semerjian, L., Shanableh, A., Semreen, M. H. & Samarai, M. Human health risk assessment of pharmaceuticals in treated wastewater reused for non-potable applications in Sharjah, United Arab Emirates. *Environ. Int.* **121**, 325–331 (2018).
33. KwarciaK-Kozłowska, A. Removal of pharmaceuticals and personal care products by ozonation, advance oxidation processes, and membrane separation. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-816189-0.00007-x
34. Rivera-Jaimes, J. A. *et al.* Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* **613–614**, 1263–1274 (2018).
35. Lin, H. *et al.* Mass loading and emission of thirty-seven pharmaceuticals in a typical municipal wastewater treatment plant in Hunan Province, Southern China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 530–536 (2018).
36. Kalia, V. C. Pharmaceutical and personal care product contamination: a global scenario. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-816189-0.00002-0
37. Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M. & Iqbal, H. M. N. Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environ. Int.* **122**, 52–66 (2019).

38. Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E. & Tsang, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* **596–597**, (2017).
39. Bai, X. *et al.* Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere* **200**, (2018).
40. Paz-Alberto, A. M. & Sigua, G. C. Phytoremediation: A Green Technology to Remove Environmental Pollutants. *Am. J. Clim. Chang.* **02**, 71–86 (2013).
41. Panja, S., Sarkar, D., Li, K. & Datta, R. Uptake and transformation of ciprofloxacin by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **142**, 200–210 (2019).
42. Mishra, S. & Maiti, A. The efficiency of *Eichhornia crassipes* in the removal of organic and inorganic pollutants from wastewater: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 7921–7937 (2017).
43. Suelee, A. L., Hasan, S. N. M. S., Kusin, F. M., Yusuff, F. M. & Ibrahim, Z. Z. Phytoremediation Potential of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*) for Treatment of Metal-Contaminated Water. *Water. Air. Soil Pollut.* **228**, (2017).
44. Maharjan, A. & Pradhanang, S. Potential of Vetiver Grass for Wastewater Treatment. *Environ. Ecol. Res.* **5**, 489–494 (2017).
45. Kiiskila, J. D., Sarkar, D., Panja, S., Sahi, S. V. & Datta, R. Remediation of acid mine drainage-impacted water by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*): A multiscale long-term study. *Ecol. Eng.* **129**, 97–108 (2019).
46. Kiiskila, J. D., Li, K., Sarkar, D. & Datta, R. Metabolic response of vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) to acid mine drainage. *Chemosphere* **240**, 124961 (2020).
47. Panja, S., Sarkar, D. & Datta, R. Vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) is capable of removing insensitive high explosives from munition industry wastewater. *Chemosphere* **209**, 920–927 (2018).
48. Datta, R. *et al.* Phytoremediation Potential of Vetiver Grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)] for Tetracycline. *Int. J. Phytoremediation* **15**, 343–351 (2013).
49. Chen, H. R. *et al.* Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. *PLoS One* **12**, 1–16 (2017).
50. He, Y. *et al.* Metabolism of Ibuprofen by *Phragmites australis*: Uptake and Phytodegradation. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 4576–4584 (2017).
51. Bartha, B., Huber, C. & Schröder, P. Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia* - How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Sci.* **227**, 12–20 (2014).
52. Bartha, B., Huber, C., Harpaintner, R. & Schröder, P. Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: Investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **17**, 1553–1562 (2010).
53. Roongtanakiat, N. & Akharawutchayanon, T. Evaluation of vetiver grass for radiocesium absorption ability. *Agric. Nat. Resour.* (2017). doi:10.1016/j.anres.2017.01.002
54. Banerjee, R., Goswami, P., Lavania, S., Mukherjee, A. & Lavania, U. C. Vetiver grass is a potential candidate for phytoremediation of iron ore mine spoil dumps. *Ecol. Eng.* **132**, 120–136 (2019).

CAPÍTULO 12

GIBBERELIC ACID DETERMINATION IN AGRICULTURAL SOILS

Data de submissão: 24/04/2023

Data de aceite: 09/05/2023

Gabriel Hernández-Morales

Departamento de Ingeniería Química
Tecnológico Nacional de
México en Celaya
Av. Tecnológico y A. García Cubas
Celaya, Gto., zip 38010, México
<https://orcid.org/0000-0002-6185-3176>

José Enrique Botello-Álvarez

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería
Tecnológico Nacional de
México en Celaya
Av. Tecnológico y A. García Cubas
Celaya, Gto., zip 38010, México
Departamento de Ingeniería Bioquímica
Tecnológico Nacional de
México en Celaya
Av. Tecnológico y A. García Cubas
Celaya, Gto., zip 38010, México
<https://orcid.org/0000-0002-8716-2066>

Marcela Cárdenas-Manríquez

Maestría en Innovación Aplicada
Tecnológico Nacional de
México en Celaya
Av. Tecnológico y A. García Cubas
Celaya, Gto., zip 38010, México
<https://orcid.org/0000-0003-2396-8519>

Ricardo Gómez-González

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
Nuevo León, Av. Universidad S/N
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, NL.
zip 64451, México
<https://orcid.org/0000-0001-6651-2015>

Pasiano Rivas-García

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
Nuevo León, Av. Universidad S/N
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, NL.
zip 64451, México
<https://orcid.org/0000-0003-3421-5272>

Brenda Ríos-Fuentes

Departamento de Ingeniería
Agroindustrial
Ingeniería en Biotecnología
Universidad de Guanajuato
Mutualismo S/N y Río Lerma
Enrique Colunga, Celaya
Gto., 38060, México
<https://orcid.org/0000-0002-5470-8261>

Ramiro Rico-Martínez

Departamento de Ingeniería Química
Tecnológico Nacional de
México en Celaya
Av. Tecnológico y A. García Cubas
Celaya, Gto., zip 38010, México

ABSTRACT: A method for the extraction, purification, and quantification of gibberellic acid, GA3, from agricultural lands was developed using liquid chromatography HPLC. Soil samples, taken at 15 and 30 cm deep, from farmlands with wheat, vegetable, and alfalfa crops were analyzed to quantify GA3 in the range of between 39 to 100 mg/ kg of dry soil. The presence of GA3 was monitored in a commercial white chickpea field. The presence of the phytohormone is affected by farming activities, as GA3 could still be detected on the soil, but it was mainly found in the roots, reaching up to 15550 mg/kg of dry root. The interactions between crops and microorganisms present in the soil and roots can be studied via this analytical method.

KEYWORDS: Gibberellic acid. HPLC. Agricultural soil.

1 INTRODUCTION

The gibberellins are phytohormones that foster the growth and development of plants and their fruits. The gibberellic acid GA3 is the most abundant and commercially relevant of the gibberellins (Idbal et al. 2001). The GA3 is synthesized by filamentous fungi and phytopathogens as *Gibberella fujikuroi*. It is also found in vegetable tissue and exudates, but the specific site where plants synthesize it has not been determined (Grupta & Chakrabarty, 2013). The use of GA3 in farming is limited due to its high price, despite its benefits. Alternative production methods, such as solid state fermentation of agri-food waste as a substrate, are studied to find an affordable option (Rodrigues et al. 2011).

The GA3 has been used in different crops via foliar spray and dipping treatment; in potato crops it is used to reduce the dormancy periods and foster the growth of shoots, using GA3 at 750 to 1000 ppm and 40 to 50 ppm, respectively (Kabede-Asalfew, 2016). In blackberry crops, a foliar spray using GA3 at 5 and 10 ppm, resulted in a significant increment in the number, weight and size of the fruit; in chickpea crops, GA3 was applied at concentrations of 10 and 20 mg/L. It was found that applying it at the start of the plant flowering enhances the development of foliage and flowers (Çolak, 2018). Gavino et al. (2008) pointed out that in China, rice crops use GA3 at a dose of 150 to 300 g ha⁻¹, while in other countries only 45 – 50 g ha⁻¹ are used due to the high cost of the phytohormone.

Several techniques have been developed for the extraction, purification, and quantification of this phytohormone due to its importance. David et al. (2017) extracted and quantified GA3 from maize kernels, using different solutions of acetonitrile and methanol in water acidified with formic acid at 5%, and pure ethyl acetate as solvents for the extraction. They used a solvent-sample ratio of 20mL by 10 g, respectively. The lixiviation process was done by means of an orbital shaker and ultrasonification; obtaining analite concentrations of 15.06 and 30.01 mg/ kg of sample. The acetonitrile – formic acid at 5% (80:20) was the best solvent for the extraction. Manzi et al. (2015)

extracted and quantified gibberellins from tangerine fruitlets, dehydrated by immersion in liquid nitrogen. A powdered sample of 200 mg was mixed with a solution of isopropanol – acetic acid (99:1), the extract was analyzed via liquid chromatography UPLC MS/MS, identifying residues of GA1, GA3, GA4, and GA7 in concentrations of between 0.7 – 56.5 ng/g of dry sample. New analytical techniques allow for the detection and quantification of these hormones in several plants and their tissues. These analytical techniques must help comprehend the synthesis and the role of these compounds in the plants (Garmendia et al. 2019).

The objective of this work is an extraction and quantification technique to assess GA3 in agricultural soils, that could foster the understanding of the different biological phenomena that take place in agricultural soils because of the microorganisms-plant interactions on the surface of the roots. The technique was used on soils from farmlands with wheat, vegetables, alfalfa, and white chickpea crops. In this last crop the concentration of GA3 was monitored through the crop cycle.

2. METHODS

2.1 SOILS

The soils samples were collected from a farm belonging to Mexico's Institute of Technology Roque (Tecnológico Nacional de Mexico in Roque) located in Celaya, Gto. (20°34'53.15"N, 100°49'36.47"W), and a farm in Santo Tomas (Salvatierra, Gto. 20°15'07.48"N, 100°55'29.49"W). The identifiers for all the samples considered in this study are presented in Table 1. The sampling technique considered 5 sampling points per hectare at depths of 15 and 30 cm (Espinosa et al. 2012). The samples taken from 5 points, approximately 2 kg, were mixed and dried at room temperature in a drying chamber equipped with an air blower. Out of the 2kg sample, one kg was selected and stored at 10°C for further analysis. Additionally, a sample of compost, bought in the city of Celaya, was also analyzed.

Table 1. Description, source, and sample identifier.

ID	Crop	Depth(cm)	Source
SA15	Alfalfa	15	Roque
SA30	Alfalfa	30	Roque
SH15	Vegetables	15	Roque
SH30	Vegetables	30	Roque
ST15	Wheat	15	Roque
ST30	Wheat	30	Roque

ID	Crop	Depth(cm)	Source
SG15	Chickpea	15	Santo Tomas
SG30	Chickpea	30	Santo Tomas
SC	Compost		Celaya

The soils underwent a physicochemical characterization according to the following parameters: texture (USDA-2014), water retention: saturation percentage (%S) and soil capacity (CC), apparent density, true density, pH, and organic matter content (NOM -021-RECNAT-2000).

2.2 EXTRACTION OF GIBBERELIC ACID FROM THE SOIL

The dry soil samples were ground in a ball mill and separated using a sieve equipped with a 100 mesh. A 65 and 35 % (v/v) solution of methanol and water acidified with 1% formic acid was used as solvent. The extraction was carried out in a sample:solvent ratio of 5g:30 mL. The solvents used are HPLC grade (Karat[®]). The sample: solvent mixture was stirred for 10 minutes using a magnetic mixer at 200 rpm, after that the mixture was subjected to sonification for 10 minutes (Branson 1800). The resulting suspension remained undisturbed for 24 h at 10°C. The supernatant was decanted and centrifuged at 6500 rpm for 5 minutes (Ohaus FC57706W). A 10 mL aliquot was filtered using a 0.45µm cellulose acetate membrane and stored in an amber vial at 10°C for its posterior HPLC analysis.

2.3 CHROMATOGRAPHIC METHOD

A liquid chromatograph HPLC Agilent 1200[®] equipped with a diode array detector (DAD) was used. A Discovery[®] HS-C18 Sigma-Aldrich 5 µm 4.6 mm x 25 cm was utilized. As the mobile phase a methanol – water acidified with formic acid at 1% solution in a 35:65 ratio was employed (Karat[®]). A constant flow of 1 mL/minute of the mobile phase was fed to the column; 50 µL were injected and a detection length wave of 245 nm was utilized.

A stock standard solution made with Gibberellin A3 (48880-5G-F Sigma Science[®]) dissolved in the mobile phase, in a 1000 mg/L concentration, was prepared. From this stock solution, standards with concentration ranging from 1 to 10 mg/L and 50 to 500 mg/L were prepared, and used to obtain calibration curves. The instrumental detection and quantification limits were determined (Quino et al. 2007). The method accuracy was blind tested by two independent analysts that were provided with a sample of a standard solution. Each analyst reported 5 concentration estimations to

the sample solution. The method accuracy is accepted if the percentage of recovery is of between 90 to 110 % of recovery. The procedure based on the Horwitz equation and relation was used to estimate the repeatability and reproducibility of the method, and the acceptance or rejection criteria of the analytical method variability (Rivera-Orozco & Rodríguez-Baéz, 2010).

The concentration of GA3 in soils was evaluated by analyzing soil samples before and after being fortified with GA3, this provided an estimate of the percentage of recovery for the extraction and extract purification processes.

2.4 ANALYSIS OF GIBBERELLINS IN SOILS DURING CHICKPEA FARMING

The usefulness of the technique developed was demonstrated by testing and quantifying GA3 in a conventional chickpea crop cycle from January to April, 2019 in a farm located in Santo Tomas in the municipality of Salvatierra, Gto. The technique was also used to assess gibberellins in the chickpea roots and foliage.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the calibration curve for GA3, and Figure 2 presents a chromatogram for a GA3 standard where its chromatographic peak is observed with a retention time of 3.987 ± 0.25 minutes, the spectrum for UV absorption is also shown with a peak of maximum absorption at 254 nm. In the accuracy test, analyst 1 obtained a recovery percentage of 96.61% with a standard deviation relative to the mean or variation coefficient of 0.98%, and absolute error of 3.38%; while analyst 2 obtained a recovery percentage of 97.08% with a variation coefficient and absolute error of 1.15% and 2.91%, respectively. Since the variation coefficients are less than 3.45%, as obtained with the Horwitz equation, the chromatographic method can be deemed as accurate. Horwitz equation is an empirical expression that correlates the expected variation coefficients when analyte samples at a specific concentration are analyzed. The data for the creation and validation of this equation was gathered from analytical test results from well-known laboratories (Rivera-Orozco y Rodríguez-Baéz,2010). Regarding the repeatability of the method, analysts 1 and 2 obtained Horwitz ratios (HorRat, variation coefficient ratio: experimental divided by the Horwitz variation coefficient) of 0.2850 and 0.3341, respectively. Since the Horwitz ratios are in the range $0.3 < \text{HorRat} < 1.3$, the chromatographic technique is considered repeatable and reproducible. And for the reproducibility between analysts, a variation coefficient of 0.7330% was obtained, with a HorRat coefficient of 0.3090. Thus, the method is considered reproducible.

Figure 1. Calibration curve of the GA3 standard in a methanol- water acidified with formic acid 1%, in a 35:65 ratio, at 254 nm detection lengthwave.

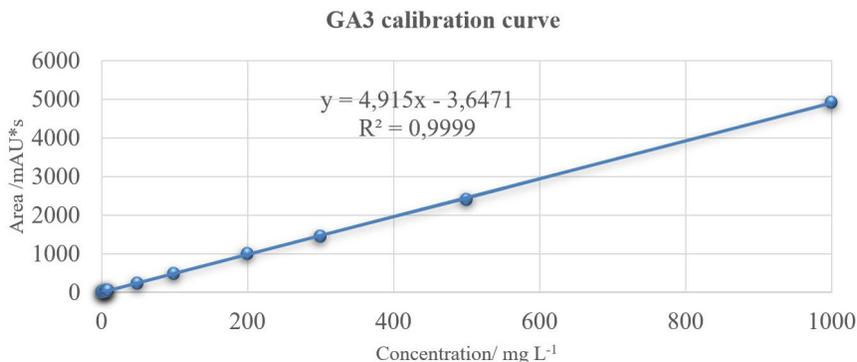
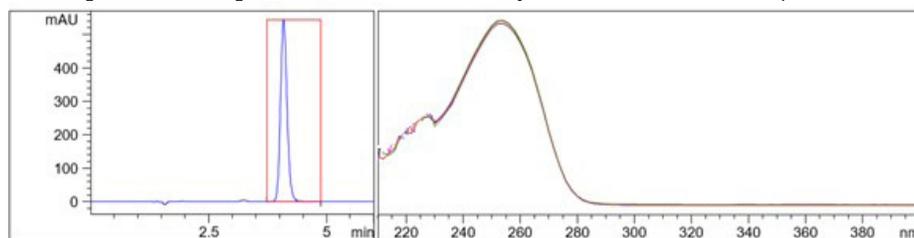


Figure 2. Chromatogram of GA3 standard at 254nm y characteristic UV absorbtion spectrum.



The characteristics of the soils considered in this study are presented in Table 2. Roque's soil is classified as a loamy sand soil, while Santo Tomas is a loam soil, and the compost is considered sandy. The loam and loamy sand soils have an optimal texture for agriculture (FAO-2009). The soils in Santo Tomas possesses the best characteristics for agriculture, since it contains enough organic matter, an almost neutral pH, and a high water-retention capacity. The compost contained large particles vegetable particles, but a extremely low water-retention capacity.

Table 2. Physico-chemical characterization of the selected soils.

Sample origin	Particle size (% p/p)			Apparent density (g/mL)	True density (g/mL)	pH	Organic matter (%)	Water retention (g of water/100 g of soil)	
	Clay	Silt	Sand					CC	% S
	Roque, Celaya.	34.71	2.70	62.58	1.1431	2.2228	8.11	4.52	38.39
Santo Tomas, Salvatierra.	43.08	1.12	55.80	1.8186	2.8577	7.56	7.52	46.77	81.85
Compost.	11.984	1.136	86.88	0.6073	0.3232	7.63	60.65	10.37	18.15

The diazotrophic bacteria in the soil around the plant root system are characterized for binding nitrogen to the soil, and to produce phytohormones. The bacteria of the genera *Azotobacter* and *Azospirillum* are capable of producing several hormones, such as, indoleacetic acid, gibberellic acid, abscisic acid, and ethylene (Narula et al. 2006). Due to the nature of these microorganisms to bind nitrogen and produce phytohormones, fostering plant development and increasing the yield in crops such as maize and wheat, several commercial inoculants were developed that can be applied to the roots of these crops (Arshad y Frankenberger, 1991). The concentration of GA3 in the soils of the crops considered, namely wheat, vegetables (broccoli), and alfalfa, are presented in Table 3. No GA3 was detected in the compost. According to Sundberg and Jönsson (2008), the pH during compost production is too low due to the high organic matter content, which inhibits bacterial activity. Additionally, compost is made from vegetable waste, while bacteria in the soil have a symbiotic relationship the plant roots.

The soil sample from the wheat farm was taken just after the wheat was threshed, when the wheat roots were still in the soil. In the vegetable farmland, the soil was sampled after fallowing and plowing the land once the broccoli was harvested. In this case, the plant roots were mechanically removed and destroyed. As for the alfalfa, since this is a crop that regrows after being harvested for the first time, the root system was intact. Despite the fact that the plants are capable of synthesizing gibberellins, the precise bioactive site has not been identified, as neither if the hormones travel inside the plant to trigger plant growth, flowering, and shoots formation (Gupta y Chakrabarty, 2013). The presence of gibberellins in the soil around the roots come mainly from microorganisms, that have developed a symbiotic relationship with the plants.

Table 3. Gibberellic acid concentration in agricultural soils.

Soil sample	Concentration mg kg ⁻¹
ST15	83.9
ST30	76.17
SH15	39.4
SH30	49.5
SA15	102.1
SA30	63.4
SC	Not Detected

3.1 GA3 DURING CHICKPEA CROP CYCLE

Samples of chickpeas, of the Sinaloa variety, and its agricultural soil were taken during the crop cycle, the sample was obtained from the center of one hectare, sampling 5 plants and its soil at 15 and 30 cm deep. The roots and foliage were dried

at room temperature with a continuous air flow. The vegetable matrices were subjected to the same extraction procedure as the soils. Table 4 shows the different agricultural activities performed, and the GA3 concentration found in the samples analyzed. The GA3 concentration was low in general, with the exception of the sample at 30 cm deep, taken just after the seeding, plant germination and emergence. No GA3 was found in the foliage, the roots did showed variable concentrations of this phytohormone, with a maximum just after an emergency surface irrigation of the crop, and a foliar spray of phytohormones and pesticides to the plants. Normally, the chickpea field is not irrigated after the seeding, unless it is subject to heat and hydric stress. Then an emergency surface irrigation takes place, at the risk of suffocating the roots and killing the plants (Morard et al. 2000). In the crop considered in this study, about 20% of the plants died due to this. Samples taken from the roots of the dead plants presented a dark color and no GA3 could be detected. The chickpea was harvested while still fresh in the pods, the healthy plants presented pale roots, its central body had a length of between 25 to 30 cm, and abundant radial nodules.

Table 4. Agricultural activities during chickpea crop cycle and GA3 determination (mg/kg dry basis).

Date	Agricultural activity	Soil 15 cm	Soil 30cm	Root	Foliage
16 /11/2018	Maize harvest				
	Sampling	17	20	NM	NM
6/01/2019	Mechanical plowing of the soil				
10/01/2019	Surface irrigation				
31/01/2019	Mechanical seeding 120 kg/ha				
14/02/2019	Sampling, 5-7 cm plants	17	1700	700	ND
24/02/2019	Sampling, 10-15cm plants	53	30	1050	ND
02/03/2019	Fumigation Dimethoate 1L/ha Enzymatic extract: 1L/ha gibberellins 32.2 ppm; indoleacetic acid 32.2 ppm; zeatin 83.2 ppm.				
16/03/2019	Sampling, 30-32cm plants	18	10	50	ND
18/03/2019	Surface irrigation				
1 /04 /2019	Fumigation Dimethoate 1L/ha Solution with gibberellic acid 4% and micronutrients 1L/ha				
5/04/2019	Sampling, 40-42 cm plants with incipient flowers and pods	35	10	1550	ND
25/04/2019	Sampling, 37-42cm plants with fully developed pods.			850	ND
26-30/04/2019	Harvest of fresh chickpea pods				

4 CONCLUSIONS

A simple and reliable analytical method for the extraction, purification and quantification of gibberellic acid in agricultural soils was developed. The method was tested in different soils with various crops, finding that the procedure allows the quantification of GA2 in concentrations of between 17 to 1700 mg/ kg of dry soil. The presence of GA3 is an indicator of the effect that agricultural activities have on the root-soil interactions.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

We extend our gratitude to the Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación Superior del Estado de Guanajuato, México: Programa FINNOVATEG for the financial support: Proyecto CFINN0382. Also, to FERTILAB de Celaya for the technical support.

REFERENCES

- Arshad, M. and Frankenberger, W.T. (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133, 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00011893>
- Çolak, A. M. (2018) Effect of melatonin and gibberellic acid foliar application on the yield and quality of Jumbo blackberry species. *Saudi J Biol Sci.* 25 (6), 1242–1246. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.06.008>.
- David, R. J., Milena, C. Y. and Penagos, J. P. (2017). Evaluación de métodos de extracción para la obtención del ácido giberélico en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Colombiana de Química.* 46(2), 45-50.
- Espinosa, M. R., Ortiz, C. F. E. and Vargas, E. V. (2012) Muestreo de suelos y preparación de muestras. Boletín desplegable para productores. INIFAP – Noreste. México.
- Garmendia, A., Beltrán, R., Zornoza, C., García-Breijo, F. J., Reig, J. and Merle, H. (2019). Gibberellic acid in Citrus spp. flowering and fruiting: A systematic review. *PLoS ONE* 14(9): e0223147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223147>.
- Gavino, R. B., Pi, Y. and Abon Jr C. C. (2008). Application of gibberellic acid (GA3) in dosage for three hybrid rice seed production in the Philippines. *Journal of Agricultural Technology.* 183-192.
- Gupta, R. and Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant Still a mystery unresolve. *Plant Signal Behav.* 8 (9): e25504. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>
- Iqbal, H. F., Tahir, A., Khalid, M.N., Haq, I. and Ahmad, A. N. (2001) Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth towards the foliar application of gibberellic acid at different growth stages. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4(4), 433-434. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2001.433.434>
- Kebede-Asalfew, G. (2016). Review on the effect of gibberellic acid on potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber dormancy breaking and sprouting. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare.* 6(7), 69-79.
- Manzi, M., Gómez-Cadenas, A. and Arbona, V. (2015) Rapid and reproducible determination of active gibberellins in citrus tissues by UPLC/ESI-MS/MS. *Plant Physiol Biochem.* 94,1-9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.015>

Morard, P., Lacoste, L. and Silvestre, J. (2000) Effect of oxygen deficiency on uptake of water and mineral nutrients by tomato plants in soilless culture. *Journal of Plant Nutrition*. 3(8):1063-1078. <https://doi.org/10.1080/01904160009382082>

Narula N., Deubel A., Gans W., Behl R.K. and Merbach W. (2006). Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ*. 52,119-129. <https://doi.org/10.17221/3355-PSE>

NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaria de Medio Ambientes y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre de 2002. Gobierno de México.

Quino, I., Ramos, O. and Guisberts, E. (2007). Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea. *Rev. Bol. Quim*. 24 (1), 2007, 53-57.

Rivera-Orozco, C. A. and Rodríguez-Baéz, M. R. Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory. Simposio de Metrología, 2010, Centro Nacional de Metrología. México 2010.

Rodrigues, C., Porto de Souza, V. L., de Oliveira, J., and Soccol, C. R. (2011). New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1-11. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.615297>.

Sundberg, C. and Jönsson, H. (2008). Higher pH and faster decomposition in biowaste composting by increased aeration. *Waste Manag*. 28(3),518-526. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.011>.

USDA (2014) Key to soil taxonomy. United States Department of Agricultura, USA. Twelfth Edition. Appendix 343-351. <https://www.nrcs.usda.gov/>.

SOBRE O ORGANIZADOR

Manuel Simões é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; Nº orcid: 0000-0002-3355-4398

ÍNDICE REMISSIVO

A

Acacia 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104

Agricultural soil 122, 123, 124, 128, 130

Aguas residuales 105, 106, 107, 108, 109, 110, 117, 118

Alder 93, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102

Apomixis 26, 27, 28

C

Camarón blanco 75, 76

Candidatus Liberibacter spp 63, 64

Carya illinoinesis koch 40, 41

Células madre 1, 2, 3, 4

Cítricos 26, 27, 28, 29, 31, 34, 37, 39, 63, 64, 66, 67, 68

Contaminantes emergentes 105, 106, 107, 108, 109, 110, 117

Cultivo intensivo bioseguro 76

Cultivos subutilizados 82

D

dinámica de crecimiento 41, 42, 43

dragón amarillo 29, 63

E

Ecosystem functioning 93, 103

Estrés 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 27

F

Fitorremediación 106, 109, 110, 117

Foto-heterotrófico 75, 76

Frecuencia y formas de consumo 82

G

Germinación 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62

Gibberellic acid 46, 122, 123, 125, 128, 129, 130, 131

Grano sano 69

H

HPLC 123, 125

Hsp70 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24

Huanglongbing 26, 29, 63, 64, 67, 68

L

Leaf litter 93, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104

Leucocitos 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23

M

Macroinvertebrates 93, 97, 100, 101, 102

Marcadores moleculares 26, 27, 28, 29, 36, 39

Micropropagación 46, 47, 51

Microsatélites 27

N

Nogal pecanero 40, 41, 42, 44

O

Orquídeas 45, 46, 47, 48, 51, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62

P

Producción agrícola 26, 41, 68, 74

Productos farmacéuticos 105, 106, 107, 110, 118

Pulpa dental 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12

R

Radiación ultravioleta 14, 15, 17, 23, 24

Regeneración 2, 11

Reguladores de crecimiento 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 59, 60

S

Silicio 69, 70

Sitophilus zeamais 69, 70, 74

Sondeo rápido 82, 84

Superficie de respuesta 106, 112, 113, 118

V

Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) 105, 106, 107, 109, 110, 111, 117